

Aus dem Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie
und der Medizinischen Klinik
mit Schwerpunkt Hepatologie und Gastroenterologie
der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

DISSERTATION

**Pilotstudie zur Evaluierung eines Impfstoffes mit *Salmonella typhi*
Ty21a als Träger für rekombinante Urease von
*Helicobacter pylori***

Zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

von
Oliver Palme
aus Esslingen am Neckar

Dekan: Prof. Dr. Joachim W. Dudenhausen

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. B. Wiedenmann

2. Prof. Dr. med. R. von Baehr

3. Prof. Dr. Th. F. Meyer

Datum der Promotion: 17.07.2003
21.06.2004

I	EINLEITUNG	1
1.	EPIDEMIOLOGIE	1
2.	MIKROBIOLOGIE VON <i>HELICOBACTER PYLORI</i>	2
2.1.	<i>Virulenzfaktoren von Helicobacter pylori</i>	3
3.	PATHOGENESE UND IMMUNOLOGISCHE REAKTION EINER <i>HELICOBACTER PYLORI</i> INFEKTION	5
3.1.	<i>Die unspezifische Immunreaktion</i>	7
3.2.	<i>Die spezifische Immunreaktion</i>	8
4.	<i>HELICOBACTER PYLORI</i> ASSOZIIERTE KRANKHEITEN	12
4.1.	<i>Gastritis</i>	12
4.2.	<i>Ulkuskrankheit</i>	13
4.3.	<i>Magenlymphom</i>	13
4.4.	<i>Magenkarzinom</i>	14
5.	THERAPIE EINER <i>HELICOBACTER PYLORI</i> INFEKTION	15
5.1.	<i>Indikation zur Therapie einer Helicobacter pylori Infektion</i>	15
5.2.	<i>Therapieregime</i>	16
5.3.	<i>Resistenzen</i>	17
6.	ÖKONOMISCHE ASPEKTE EINER <i>HELICOBACTER PYLORI</i> THERAPIE	18
7.	IMPFSTOFF	18
7.1.	<i>Impfstudien an Tieren</i>	19
7.2.	<i>humane Impfstudien</i>	20
7.3.	<i>Urease als Antigen</i>	22
7.4.	<i>Salmonella typhi als Adjuvans</i>	22
8.	FRAGESTELLUNG	24
II	MATERIAL UND METHODEN	25
1.	MATERIAL	25
1.1.	<i>Antigene</i>	25
1.2.	<i>Antikörper</i>	26
1.3.	<i>Lösungen</i>	27
1.4.	<i>weitere Materialien und Reagenzien</i>	28
1.5.	<i>Charakterisierung des Kontrollstammes Salmonella typhi Ty21a</i>	28
1.6.	<i>Charakterisierung des Impfstammes Salmonella typhi Ty21a(pDB1)</i>	29
2.	METHODEN	31
2.1.	<i>Aufbau der klinischen Studie zur Untersuchung eines rekombinanten Impfstoffes gegen Helicobacter pylori am Menschen</i>	31
2.2.	<i>Anzucht des Impfstammes Salmonella typhi Ty21a(pDB1) und des Kontrollstammes Salmonella typhi Ty21a</i>	35
2.3.	<i>Gewinnung der mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut (PBMZ)</i>	36
2.4.	<i>Proliferationsassay</i>	37
2.5.	<i>B-Zell-Elispot</i>	39
2.6.	<i>T-Zell-Elispot</i>	41
2.7.	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay (Elisa)</i>	42
III	ERGEBNISSE	46
1.	WACHSTUMSKURVE UND ANZAHL DER VERABREICHTEN BAKTERIEN	46
2.	NEBENWIRKUNGEN	47
3.	HUMORALE IMMUNANTWORT	48
3.1.	<i>B-Zell- Elispot</i>	48
3.2.	<i>Elisa</i>	50
4.	ZELLULÄRE IMMUNANTWORT	52
4.1.	<i>T-Zell-Elispot</i>	52
4.2.	<i>Proliferationsassay</i>	55
4.3.	<i>Elisa</i>	58
IV	DISKUSSION	61
1.	KLINISCHE VERTRÄGLICHKEIT UND NEBENWIRKUNGSPROFIL	61
2.	IMMUNOGENITÄT DES IMPFSTAMMES SALMONELLA TYPHI TY21A(pDB1)	64
3.	DISKUSSION DER EINZELNEN IMMUNOLOGISCHEN TESTERGEBNISSE	67
3.1.	<i>Humorale Immunantwort gegen den Vektor Salmonella typhi Ty21a</i>	67

3.2.	<i>Zelluläre Immunantwort gegen den Vektor Salmonella typhi Ty21a</i>	72
3.3.	<i>Humorale Immunantwort gegen das Antigen Urease von Helicobacter pylori</i>	79
3.4.	<i>Zelluläre Immunantwort gegen das Antigen Urease von Helicobacter pylori</i>	83
V	ZUSAMMENFASSUNG	86
VI	REFERENZEN	88
VII	DANKSAGUNG	107
VIII	ANHANG	108
IX	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	113
X	LEBENS LAUF	114

Abkürzungsverzeichnis

APZ:	Antigen präsentierende Zelle
ASZ:	Antikörper sezernierende Zelle
BSA:	Bovine Serum Albumine
CagA:	Zytotoxin assoziiertes Gen A
CD:	cluster of differentiation
Cfu:	colony forming units
Cpm:	counts per minute
Da:	Dalton; Maß für das Molekulargewicht
DTH:	delayed type hypersensitivity: Überempfindlichkeitsreaktion vom verzögerten Typ
Elisa:	Enzyme-linked immunosorbent assay
H. pylori:	Helicobacter pylori
HP-NAP:	Helicobacter pylori Neutrophile aktivierendes Protein
ICAM-1:	intracellular adhesion molecule 1
IFN:	Interferon
Ig:	Immunglobulin
IL:	Interleukin
LPS:	Lipopolysaccharid
MHC:	major histocompatibility complex
MALT:	mucosa associated lymphatic tissue
Mio.:	Million
NKZ:	natürliche Killer-Zellen

OD: optical density oder optische Dichte

PBS: Phosphate Buffered Saline

PBMZ: periphere Blut mononukleäre Zellen

PCR: Polymerase Chain Reaction

PPI: Protonen Pumpen Inhibitor

Rpm: rounds per minute

SI: Stimulation Index

S. typhi: Salmonella enterica, subspecies enterica Serovar Typhi

T_H-Zelle: T-Helfer-Zelle, Subpopulation

Ure A: Urease Untereinheit A

Ure B Urease Untereinheit B

VacA: vacuolisierendes Zytotoxin A

I Einleitung

Helicobacter pylori (*H. pylori*) ist ein ubiquitär verbreitetes, gramnegatives Bakterium, das erstmals im April 1982 aus der Magenbiopsie eines Patienten des Royal Perth Hospital in West Australien angezüchtet werden konnte (Warren and Marshall 1983). Der Erreger wurde zuerst *Campylobacter pyloridis*, später dann *Campylobacter pylori* benannt. Im Jahr 1989 erhielt der Keim die korrigierte taxonomische Bezeichnung *H. pylori* (Goodwin, C. S. 1994).

Bis zum Zeitpunkt der Entdeckung von *H. pylori* galt es als unmöglich, daß ein Mikroorganismus im sauren Milieu des Magens überleben kann. Der Nachweis einer Besiedlung des Magens durch ein Bakterium und Hinweise aus Selbstversuchen auf einen Zusammenhang zwischen einer Infektion mit *H. pylori* und dem klinischen Bild einer Gastritis, machten erstmals eine infektiöse Genese verschiedener Krankheiten des oberen Gastrointestinaltraktes vorstellbar. Seitdem wurden zahlreiche Studien zu Epidemiologie und klinischer Bedeutung der *H. pylori* Infektion unternommen. Die weltweite Verbreitung sowie die Assoziation der chronischen *H. pylori* Infektion mit Krankheiten wie Gastritis und Magenkarzinom unterstreichen die Bedeutung dieses Bakteriums.

1. Epidemiologie

Infektionen mit *H. pylori* kommen weltweit vor und betreffen alle Bevölkerungsgruppen. Insgesamt geht man von einer weltweiten Infektionsrate von 50% aus (Goodman, K. J. *et al.* 2001).

Die Prävalenz der *H. pylori* Infektion variiert in Abhängigkeit von der geographischen Region, dem Alter, der ethnischen Zugehörigkeit und dem sozioökonomischen Status (Brown, L. M. 2000). Die Infektionsrate ist in sog. „Entwicklungsländern“ am höchsten (Bangladesh: 92%, Elfenbeinküste: 70-80%; Pounder, R. E. *et al.* 1995 und Brown, L. M. 2000), zeigt aber auch in Industrienationen wie z.B. in Japan Raten bis zu 80% (The Eurogast Study Group 1993). In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, daß die Prävalenz der Infektion mit zunehmendem Alter ansteigt, und daß pro Lebensjahr 1%

Neuinfizierte zu erwarten sind. Neuinfektionen finden v.a. im Kindes- bzw. Jugendalter statt (Bodhidatta, L. 1993). Außerdem wurde beobachtet, daß die Infektionen in „clustern, wie z.B. familiär gehäuft, auftreten können (Drumm, B. *et al.* 1990).

Der Übertragungsmodus der Infektion ist noch nicht abschließend geklärt. Sowohl eine fäkal-orale als auch eine oral-orale Übertragung werden diskutiert (Megraud, F. 1995), aber auch andere Übertragungswege, wie z.B. eine Infektion durch Trinkwasser, Gemüse oder Tiervektoren könnten eine Rolle spielen (Brown, L. M. 2000).

2. Mikrobiologie von *Helicobacter pylori*

Vor der Besprechung der einzelnen Krankheitsbilder möchte ich die mikrobiologischen Charakterisierung von *H. pylori* sowie die bisherigen Erkenntnisse über die immunologischen Vorgänge einer Infektion mit *H. pylori* darstellen. Mikrobiologie und Immunologie spielen nicht nur für das Verständnis der *H. pylori* assoziierten Krankheiten eine Rolle sondern sind auch für die Entwicklung eines Impfstoffes von zentraler Bedeutung.

Helicobacter pylori ist wie *Helicobacter felis* und andere *Helicobacter*-Arten ein Teil der Gattung *Helicobacter*. Zusammen mit der Gattung *Wolinella* bildet *Helicobacter* die Familie der *Helicobacteraceae*. Die Familie der *Helicobacteraceae* befindet sich zusammen mit der Familie *Campylobacteriaceae* in der Ordnung der *Campylobacterales*, die zur Klasse der *Epsilonproteobacteria* gehört (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology).

Das Bakterium kommt in einfach gebogener oder spiralförmiger (mit maximal drei Windungen) Zellform vor und besitzt unipolar 3-6 Flagellen, die als besonderes morphologisches Merkmal von einer membranartigen Hülle umgeben sind (Owen, R. J. 1998).

H. pylori wächst am besten auf serumhaltigen Festnährböden unter mikroaerophilen Bedingungen (90% N₂, 5%CO₂, 5%O₂). Auf solchen Platten bilden die Bakterien nach 3-5 Tagen bis zu 1,5 mm große glänzende, transparente Kolonien (Kayser, F. H. *et al.* 1998).

Identifizierungsmerkmale von *H. pylori* sind neben den beschriebenen morphologischen Eigenschaften der positive Test für Urease, Katalase und Oxidase. Des weiteren

zeichnet sich *Helicobacter pylori* durch das Fehlen der Nitratreduktase und der Hippurat-Hydrolyse, den Nachweis der Gamma-Glutamyltranspeptidase und durch eine Resistenz gegen Nalidixinsäure sowie eine Sensibilität gegenüber Cefalotin aus (Malfertheiner, P. 2000).

H. pylori hat mit 1,7 Mio. Basenpaaren ein relativ kleines Genom (Bukanov, N. O. *et al.* 1994). Dies korreliert mit den hohen Nährstoffansprüchen dieses Bakteriums. Ungefähr 50 % der Stämme tragen Plasmide, deren Funktion bisher jedoch nicht aufgeklärt werden konnte (Marais, A. *et al.* 1999, Suerbaum, S. 2000).

Ungewöhnlich ist die hohe genetische Variabilität von *H. pylori* Stämmen (Suerbaum, S. 2000). Rekombinationen zwischen verschiedenen *H. pylori* Stämmen, aber auch Neumutationen werden hierfür verantwortlich gemacht (Wang, G. *et al.* 1999). Die biologische Relevanz der hohen genetischen Variabilität ist bis jetzt noch ungeklärt.

2.1. Virulenzfaktoren von *Helicobacter pylori*

2.1.1. Urease

Zwei Schutzmechanismen -ein saurer pH (pH: 2) und die Magenperistaltik verhindern normalerweise eine Kolonisation des Magens. *H. pylori* ist dabei das einzige Bakterium, das zu einer Besiedlung des Magens in der Lage ist.

Ein Schutz gegen die Magensäure bietet die Produktion von Urease.

Urease spaltet das im Magensaft in geringen Mengen vorkommende Ammoniak in CO₂ (Kohlendioxid) und NH₃ (Ammoniak), letzteres neutralisiert die Magensäure.

H. pylori kann so in einer pH-neutralen Nische des Magens, geschützt vor den aggressiven Effekten der Salzsäure, überleben. Für eine Kolonisation des Magens ist Urease damit absolut essentiell (Segal, E. D. *et al.* 1992; Solnick, J. V. *et al.* 1995).

Die Urease wird vom Bakterium sezerniert, wobei der genaue Mechanismus der Ausschleusung bis jetzt noch nicht aufgeklärt werden konnte (Mobley, H. L. T. *et al.* 1995; Vanet, A. *et al.* 1998).

Neben der Funktion der Säureneutralisation gibt es aus Tierversuchen Hinweise auf weitere Funktionen der Urease. So konnte nachgewiesen werden, allerdings bislang nur *in vitro*, daß der aus Harnsäure freigesetzte Ammoniak als Stickstoffquelle zur

Aminosäuresynthese bei *H. pylori* dient (Williams, C. L. *et al.* 1996).

Smoot *et al.* weisen der Urease noch eine immunmodulatorische Bedeutung zu. Diese Autoren diskutieren des weiteren über einen eventuellen Zusammenhang zwischen der Urease und der Entstehung von Gewebeschäden im Magen. Dieser Mechanismus wird wahrscheinlich durch Hydroxylionen vermittelt. Hydroxylionen entstehen bei der Reaktion von Wasser mit Ammoniak und sind für Epithelzellen toxisch (Smoot, D. T. *et al.* 1990).

Die Urease von *H. pylori* ist mit 550kDa ein relativ großes Molekül und läßt sich in insgesamt 12 Untereinheiten unterteilen. Man unterscheidet jeweils 6 Untereinheiten UreA mit ca. 26 kDa und 6 Untereinheiten UreB mit ca. 61 kDa. Zusätzlich enthält jedes Molekül Urease zwei Nickelatome, ohne die das Enzym nicht aktiv ist (Labigne, S. R. *et al.* 1991).

2.1.2. Vakuolisierendes Zytotoxin VacA

Das vakuolisierende Zytotoxin VacA ist ein Protein in der Größe von 95 kDa (Cover and Blaser 1992). Es zeigt keine Aminosäuresequenzhomologien mit anderen bekannten Toxinen (Dundon, W. G. *et al.* 2001).

Das Toxin wird aus der Bakterienzelle in das umgebende Milieu sezerniert (Schraw, W. *et al.* 1999). Es führt in Zellkulturen zu einer charakteristischen Schädigung in Form einer Vakuolisierung des Zytoplasmas. Diese Vakuolisierung wird durch die Bildung transmembranöser Kanäle in intrazellulären Kompartimenten und durch eine Membranfusion verursacht (Dundon W. G. *et al.* 2001).

Das VacA Gen ist in allen *H. pylori* Stämmen vorhanden. VacA wird jedoch nicht von allen Stämmen gebildet (Cover T. L. 1996).

Anhand unterschiedlicher Signalsequenzen von VacA wurden zwei Genotypen –Genotyp S1 und Genotyp S2- unterschieden.

Die ursprüngliche Annahme, daß diese Genotypen mit einem unterschiedlichen Ausmaß an sezerniertem VacA und damit mit einem unterschiedlichen klinischen Bild der Infektion assoziiert sind (Atherton, J. C. *et al.* 1997), konnte nicht verifiziert werden (Graham, D. Y. *et al.* 2000; Yamaoka, Y. *et al.* 1999).

2.1.3. Zytotoxin-assoziiertes Gen A: CagA

Die Transkription und Translation des Zytotoxin-assoziierten Gens CagA führt zur Bildung eines 128-140kDa Proteins, dem sog. CagA-Antigen. Das CagA-Antigen ist bekannt für seine starke Immunogenität (Covacci, A. *et al.* 1993; Tummuru, M. K. *et al.* 1993)

Die Bildung des CagA-Antigens ist statistisch korreliert mit der Bildung des VacA-Zytotoxins. CagA ist jedoch nicht bei allen *H. pylori* Stämmen vorhanden. Durch mehrere Studien wurde mittlerweile belegt, daß CagA positive Stämme von *H. pylori* eine stärkere Immunantwort induzieren als CagA negative Stämme.

Durch die verstärkte Freisetzung von Entzündungsmediatoren sind CagA positive Stämme signifikant häufiger mit dem Auftreten der Ulkuskrankheit (Tham, K. T. *et al.* 2001), des MALT-Lymphoms (Eck, M. *et al.* 1997) und des Magenkarzinoms assoziiert (Parsonnet, J. *et al.* 1997).

Neuere Studien weisen nach, daß das CagA-Protein über ein Typ IV Sekretionsmechanismus in die Epithelzellen des Magens transloziert wird und dort den Phosphorylierungsgrad bestimmter Proteine beeinflusst (Odenbreit, S. *et al.* 2000 und Backert, S. *et al.* 2000). Wie diese Veränderungen innerhalb der Magenepithelzelle mit der Auslösung einer starken Immunantwort in Zusammenhang stehen, ist bislang jedoch unbekannt (Dundon, W. G. *et al.* 2001).

H. pylori Stämme werden, je nachdem ob sie das VacA und das CagA Antigen produzieren, in zwei große Gruppen unterteilt. Typ I Stämme von *H. pylori* produzieren –im Gegensatz zu Typ II Stämmen- sowohl das CagA Antigen als auch das VacA Antigen (Xiang, Z. *et al.* 1995).

3. Pathogenese und immunologische Reaktion einer *Helicobacter pylori* Infektion

Der Verlauf einer *H. pylori* Infektion läßt sich aus dem Zusammenspiel von Virulenzfaktoren des Keimes und der Immunantwort des Wirtes ableiten.

Der erste Schritt einer Infektion mit *H. pylori* ist die orale Aufnahme der Bakterien und deren chemotaktische Orientierung zum gastralen Mukus hin sowie das aktive Eindringen des Bakteriums in den Mukus.

Dabei sezerniert *H. pylori* Enzyme (z.B. Urease, Phospholipase C u.a.), was dem Bakterium eine Passage des sauren Mukus und der dem Magenepithel aufliegenden Phospholipidschicht ermöglicht. Einige Bakterien adhäreren direkt am Magenepithel, während der größte Teil der Bakterien sich in der dem Magenepithel anliegenden Mukusschicht ohne direkten Kontakt zum Epithel aufhält (Shimizu, T. *et al.* 1996; Schreiber, S. *et al.* 1999). Welche Rezeptoren und Liganden für die spezifische Adhärenz ursächlich sind, ist Gegenstand aktueller Forschung (Clyne, M. *et al.* 1997).

Direkte Faktoren, wie die Sekretion verschiedener Enzyme (wie z.B. Urease, Phospholipase), führen im Zusammenspiel mit indirekten Faktoren, wie der Immunreaktion des Wirtes auf die Infektion, aber auch der Adhärenz von *H. pylori* an das Magenepithel, zu einer entzündlichen Veränderung der Magenschleimhaut, die für das Überleben des Bakteriums notwendig ist.

Die Immunreaktion des Wirtes wird dabei durch Freisetzung zahlreicher entzündlicher Mediatoren (Interleukine, Interferone, $\text{TNF}\alpha$) moduliert (Genta, R. M. 1997).

Gelingt *H. pylori* die Persistenz im Magen – d.h., kommt es nicht zu einer Selbstheilung und damit zu einer Elimination des Bakteriums – entwickelt sich eine chronische Gastritis.

Die meisten Infizierten bleiben dabei asymptomatisch und die Entzündung der Mucosa kann nur histologisch nachgewiesen werden. In 10 bis 20% der Fälle entwickeln die Betroffenen jedoch gastrointestinale Erkrankungen wie z.B. die Ulkuskrankheit aber auch das Magenkarzinom (s. Abb. 1)

Das Ausmaß der Gastritis, d.h. das Ausmaß der subjektiv empfundenen Beschwerden und das Ausmaß der gastralen Läsionen, ist dabei interindividuell sehr verschieden.

Diese Variabilität läßt sich dadurch erklären, daß es einerseits unterschiedlich pathogene Stämme von *H. pylori* gibt, und daß sich andererseits die Immunantwort des Wirtes von Individuum zu Individuum unterscheidet (Shimoyama, T. *et al.* 1998). Außerdem ist eine Schädigung des Magenepithels von zusätzlichen exogenen Faktoren, wie Medikamenteneinnahme, Alkohol-, Koffein- und Nikotin- Zufuhr und endogenen Faktoren wie psychogenem Streß, verminderter gastraler Durchblutung und Vitamin-C-Mangel abhängig (Harrisons Innere Medizin, 1995).

Generell läßt sich die Immunantwort auf eine *H. pylori* Infektion in eine unspezifische und eine spezifische Reaktion unterteilen.

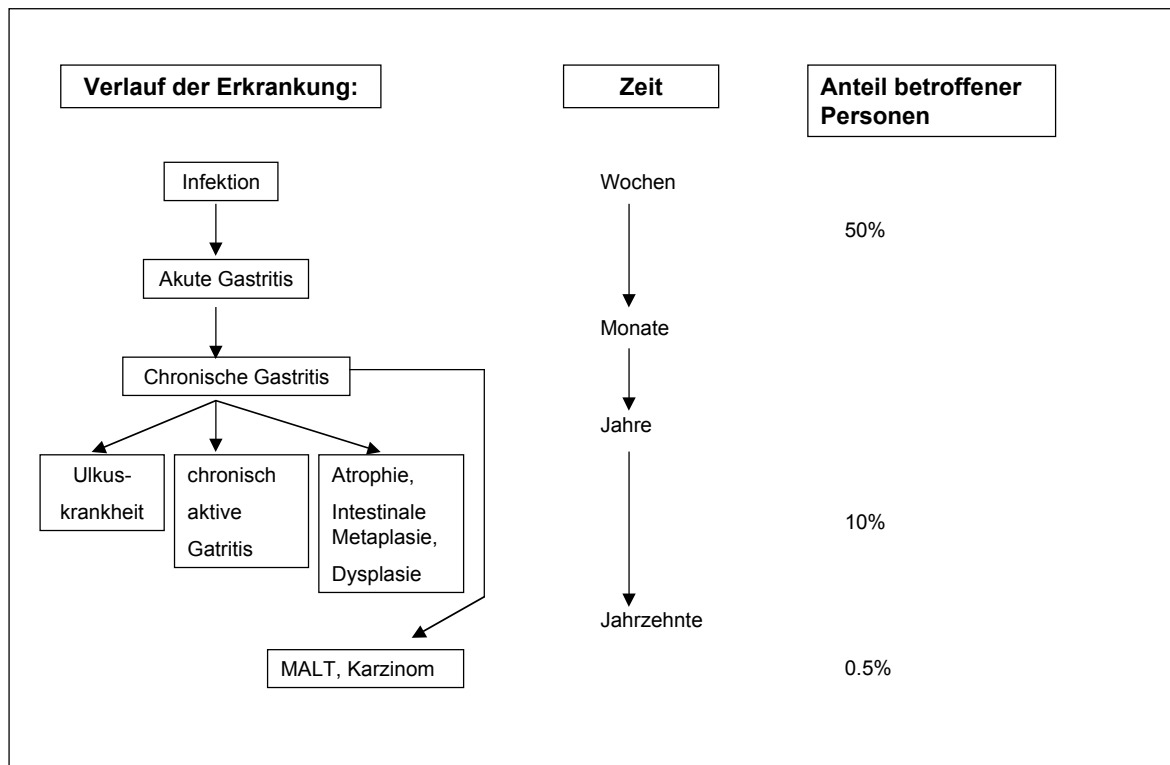


Abb. 1: Pathogenese einer *H. pylori* Infektion

3.1. Die unspezifische Immunreaktion

Eine unspezifische Immunreaktion lässt sich in verschiedene Bestandteile unterteilen. Neben den physiko-chemischen Barrieren der Haut und Schleimhäute, spielen Effektormoleküle (z.B. das Komplementsystem), Effektorzellen (z.B. Makrophagen, neutrophile Granulozyten und natürliche Killer-Zellen (NKZ)) und von den Effektorzellen gebildete Mediatoren (Interferone, Tumor-Nekrose-Faktor und andere) eine Rolle (Abbas, A. K. *et al.* 1996).

Der erste direkte Kontakt von *H. pylori* mit dem Epithel der Magenschleimhaut führt zur Aktivierung der unspezifischen Immunreaktion.

Es kommt dabei zu intrazellulären Veränderungen in den Magenepithelzellen. Diese Veränderungen stellen sich als Reorganisation von Actin und somit als eine Veränderung des Zytoskeletts dar.

Zusätzlich wird eine vermehrte Expression des IL-8-Gens und damit eine vermehrte Sekretion von IL-8 induziert (Crabtree, J. E. *et al.* 1994; Crowe, S. E. *et al.* 1995).

Auf diese Stimuli hin wird die Immunantwort des Wirtes eingeleitet, die eine deutliche Infiltration der Magenschleimhaut mit neutrophilen Granulozyten gekennzeichnet ist. Diese bilden dann selbst die Quelle von entzündungsfördernden Zytokinen, wie IL-1, $\text{TNF}\alpha$ und IL-8 (Strieter, R. M. *et al.* 1992).

Auch Mastzellen spielen eine Rolle bei der Einleitung der unspezifischen Reaktion auf den Erreger. Bei der Degranulation der Mastzellen kommt es über die Freisetzung von Mediatoren (z.B. Histamin) zur Permeabilitätssteigerung des Endothels, zur Induktion der Zytokinsekretion aus peripheren Monozyten, zur Stimulation der Adhärenz von Neutrophilen an das endotheliale Epithel und zur Chemotaxis und Aktivierung von Neutrophilen und Monozyten (Yoshida, N. *et al.* 1993).

Bakterielle Bestandteile, die die Degranulation der Mastzellen bewirken, sind u.a. Lipopolysaccharide (LPS) und LPS- freie Oberflächenkomponenten von *H. pylori* (Mai, U. E. H. *et al.* 1991), sowie das sog. *H. pylori* neutrophil activating Protein (HP-NAP) (Kurose, I. *et al.* 1994).

Die Aufnahme bakterieller Produkte wird durch die Infiltration der Magenschleimhaut, durch neutrophile Zellen und durch das vakuolisierende Zytotoxin begünstigt (Tufano, M. A. *et al.* 1994).

Diese bakteriellen Bestandteile können von Antigen präsentierenden Zellen (APZ) –wie z.B. Makrophagen/Monozyten- aufgenommen werden. APZ selbst können über die Präsentation der Antigene an Lymphozyten die spezifische Immunreaktion einleiten.

3.2. Die spezifische Immunreaktion

Die spezifische Immunantwort gegen *H. pylori* wird i.A. in eine humorale und eine zelluläre Immunantwort unterteilt.

3.2.1. Humorale Immunantwort gegen *Helicobacter pylori*

B-Lymphozyten sind die Vermittler der humoralen Immunität. Nach spezifischer Aktivierung durch eine APZ und unterstützt durch T-Helfer-Lymphozyten, beginnen B-Lymphozyten mit der klonalen Expansion und Differenzierung zu Plasmazellen. Die

Plasmazelle sezerniert Antikörper, die die Effektoren der spezifischen humoralen Immunität darstellen.

Alle Patienten mit chronischer *H. pylori* Gastritis reagieren mit der Bildung von spezifischem IgM, IgA und IgG Antikörpern auf eine chronische Infektion mit *H. pylori* (Malfertheiner, P. 2000).

Alle drei Antikörperklassen lassen sich dabei i.A. sowohl lokal (im Magengewebe) als auch systemisch (im Serum) nachweisen (Valnes, K. *et al.* 1989).

Der Nachweis von spezifischen IgG hat dabei für die Diagnostik und die Überprüfung des Therapieerfolges mehr Bedeutung als der Nachweis von spezifischem IgA oder spezifischem IgM (Rathbone, B. J. *et al.* 1986).

Eine IgM Sekretion wird generell nur in der akuten Phase der Infektion nachgewiesen (Sobala, G. M. *et al.* 1991).

Sowohl bei der mucosalen IgA Antwort als auch bei der systemischen IgG Antwort wurde eine deutliche Heterogenität bezüglich der spezifischen Antigene beobachtet (Von Wulffen, H. *et al.* 1988).

Die Bedeutung der spezifischen Antikörper für die Infektabwehr und die Immunpathologie der Gastritis ist noch unklar. So haben Studien an „knockout“ Mäusen, die keine Antikörper produzieren können, gezeigt, daß für die effektive Bekämpfung einer *H. pylori* Infektion die humorale Immunreaktion nicht von zentraler Bedeutung ist (Ermak, T. H. *et al.* 1998; Blanchard, T. G. *et al.* 1998).

Es wird vermutet, daß v.a. die mucosalen IgA Antikörper protektive Funktionen ausüben. So konnte *in vitro* gezeigt werden, daß anti-VacA-Antikörper vom IgA Subtyp eine Vakuolisierung des Epithels verhindern (Figura, N. *et al.* 1994).

Weitere Funktionen der IgA Antikörper sind u.a. eine Verhinderung der bakteriellen Adhäsion und Motilität und eine Toxinneutralisation (Crabtree, J. E. 1996).

Spezifische IgM und IgG Antikörper führen zu einer Opsonisierung von *H. pylori*, was die Phagozytose des Bakteriums erleichtert (Malfertheiner, P. 2000).

Im Rahmen dieser Antikörper-vermittelten Immunreaktionen wird vermutet, daß es zu Kreuzreaktionen zwischen Antigenen von *H. pylori* und der Magenmucosa kommen kann, was zu autoimmun induzierten Schäden führen könnte.

Dies gilt sowohl für das O-Antigen von *H. pylori*, das strukturelle Ähnlichkeiten mit den Lewis X-Ketten von Zelloberflächenstrukturen hat (Aspinall, G. O. *et al.* 1994), als auch für das Hsp-Protein von *H. pylori*, daß, wie andere bakterielle Hitzeschockproteine auch, eine hohe Homologie zu humanen Hitzeschockproteinen aufweist (Macchia, G. *et*

al. 1993). Die Ausheilung der Gastritis nach erfolgreicher Eradikation deutet jedoch darauf hin, daß diese Kreuzreaktionen zumindest langfristig, d.h. über das Abklingen der Infektion hinaus, keine wesentliche Bedeutung haben.

3.2.2. zelluläre Immunantwort gegen *Helicobacter pylori*

Träger der zellulären Immunität sind die T-Lymphozyten. Nach spezifischer Aktivierung durch eine APZ kommt es zur klonalen Expansion und Differenzierung des T-Lymphozyten. Man unterscheidet:

1. T-Suppressor-Lymphozyten
2. T-Zytotoxische-Lymphozyten und
3. T-Helfer-Lymphozyten.

T-Suppressor-Lymphozyten können die Aktivierung der funktionell kompetenten, antigenspezifischen T-und/oder B-Lymphozyten regulieren und hemmen (Abbas, A. K. *et al.* 1996).

T-Zytotoxische-Lymphozyten lysieren Zellen, die fremde Antigene produzieren und diese auf dem „major histocompatibility complex (MHC)“ I präsentieren.

T-Helfer-Lymphozyten sind von zentraler Bedeutung für die Elimination einer Infektion mit *H. pylori*. Die Aufgabe dieser Zellen besteht u.a. darin, die Proliferation von T-Zellen, B-Zellen und Makrophagen über die Sekretion verschiedener Zytokine anzuregen (Abbas, A. K. *et al.* 1996). T-Helfer-Lymphozyten werden nach dem Muster ihrer Zytokinproduktion in Subpopulationen unterteilt. So unterscheidet man u.a. die Klasse der Th-1-Zellen und die Klasse der Th-2-Zellen.

Th-1-Zellen produzieren v.a. Interferon- γ (IFN- γ) und Interleukin 2 (IL-2). Das sind Zytokine, die Antigen-unabhängig die Phagozyten aktivieren (Scott, P. *et al.* 1995) und sowohl eine zellvermittelte Immunität als auch eine Überempfindlichkeitsreaktion vom verzögerten Typ (sog. „delayed type hypersensitivity (DTH)“) induzieren können (Abbas, A. K. *et al.* 1996). Die Th1 vermittelte Immunantwort wird oft auch als inflammatorische Immunantwort bezeichnet.

Im Gegensatz dazu zeichnen sich Th-2-Zellen durch die Sekretion von IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 u.a. Zytokine aus. IL-4 stimuliert die IgE-Antikörperproduktion, IL-5 aktiviert u.a. eosinophile Granulozyten und IL-10 und IL-13 können zusammen mit IL-4 die

zellvermittelte (also die Th-1-induzierte) Immunität hemmen (Abbas, A. K. *et al.* 1996). Diese Th2 vermittelte Antwort wird deshalb oft auch als antiinflammatorisch bezeichnet. Man geht heute davon aus, daß eine Einteilung der T-Helfer-Lymphozyten in Th-1- und Th-2-Zellen eine zu vereinfachte Darstellung ist. Vielmehr stellen die Th1- und die Th-2-Subpopulationen die zwei extremen Varianten einer Vielzahl unterschiedlicher Subpopulationen an T-Helfer-Lymphozyten dar, wobei jede dieser Subpopulation ein unterschiedlichem Muster an Zytokinen sezerniert (Kelso, A. 1995).

Die zelluläre Immunantwort des Wirtes auf eine *H. pylori* Infektion scheint eher eine Th1-vermittelte Immunität aufzuzeigen. Karttunen *et al.* konnten nachweisen, daß es während einer Infektion mit *H. pylori* zu einer Zunahme IFN- γ produzierender T-Lymphozyten in der Mucosa des Magens kommt (Karttunen, R. *et al.* 1995) und Tarkkanen *et al.* wiesen nach, daß Leukozyten aus dem peripheren Blut bei Stimulation mit *H. pylori* IFN- γ produzieren (Tarkkanen, J. *et al.* 1993).

Untersuchungen im Mausmodell deuten darauf hin, daß eine gleichzeitig stattfindende Th-2 Aktivierung dem Zweck dient, eine überschießende Immunantwort zu verhindern (Mohammadi, M. *et al.* 1997).

Ob eine Th1 basierte Immunantwort oder aber eine Th2 basierte Immunantwort für die Elimination von *H. pylori* und damit für die Verlaufsform der Infektion von Bedeutung ist, ist gegenwärtig noch Gegenstand der Diskussion.

Für eine Th2 basierte Immunantwort spricht eine Studie von Radcliff *et al.* Hier konnte durch Untersuchungen an IL-4 „knockout“- Mäusen (Mäuse, die kein IL-4 mehr produzieren konnten) gezeigt werden, daß eine Protektion gegenüber einer Infektion mit *Helicobacter felis* und *H. pylori* bei diesen Mäusen nicht mehr möglich war (Radcliff, F. *et al.* 1996).

Auf der anderen Seite konnten die selben Untersucher nachweisen, daß es bei IFN- γ „knockout“ Mäusen ebenfalls zu einer verminderten Protektion gegenüber Infektion mit *Helicobacter* kommt (Radcliff, F. *et al.* 1997).

4. *Helicobacter pylori* assoziierte Krankheiten

4.1. Gastritis

Eine Gastritis ist eine Magenschleimhautentzündung, bei der die normale Histioanatomie und Physiologie des Magens gestört ist. Sie geht mit den klinischen Zeichen Übelkeit, Erbrechen, Druckgefühl und Aufstoßen einher. Es werden akute und chronische Formen unterschieden. In Deutschland existieren zwei Klassifikationssysteme zur weiteren Differenzierung der chronischen Gastritiden. Zum einen das „ABC“-System und zum anderen das aktualisierte Sydneysystem. Gemäß dem „ABC“-System werden die chronischen Gastritiden weiter unterteilt in Typ A (autoimmune Pathogenese), Typ B (bakterielle Pathogenese), Typ C (chemische-toxische Pathogenese) Gastritiden und Sonderformen. Das aktualisierte Sydneysystem trifft eine Unterteilung der chronischen Gastritis gemäß Ätiologie, Topographie und Morphologie. Zudem unterscheidet man, je nach Schweregrad der histologischen Schädigung, oberflächliche, transmuköse und atrophische Gastritiden (Riede-Schäfer 1995). Klinisch wird die Gastritis nach der sog. Sidney-Klassifikation unterteilt (Herold, G. 2000)

Die ersten Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen *H. pylori* und Gastritis lieferten die Selbstversuche der Entdecker des Bakteriums (Marshall and Warren 1985 and Morris, A. *et al.* 1987). Inzwischen gilt es, belegt durch epidemiologische Studien, Tierversuche (Krakowka, S. *et al.* 1987) und therapeutische Studien mit Langzeitbeobachtungen (McCarthy, C. *et al.* 1995), als sicher, daß ein kausaler Zusammenhang zwischen einer Infektion mit *H. pylori* und der klinischen Manifestation einer Gastritis besteht.

Eine akute Gastritis, ausgelöst durch eine akute Infektion mit *H. pylori*, ist selten zu beobachten (Riede-Schäfer 1995). Dagegen sind durchschnittlich 85% der chronischen Gastritiden verursacht durch eine chronische Infektion mit *H. pylori* (Typ B) (Herold, G. 2000).

Komplikationen der chronischen Gastritis (Typ B) sind v.a. Gastroduodenalulcera, Magenkarzinom, Autoimmungastritis und MALT-Lymphome (Herold, G. 2000).

4.2. Ulkuskrankheit

Per definitionem ist ein Ulkus ein Substanzdefekt, der die lamina muscularis mucosae der Schleimhaut überschreitet. Als Ulkuskrankheit bezeichnet man die Symptomatik von Magengeschwüren (ulcus ventriculi) und Zwölffingerdarmgeschwüren (ulcus duodeni). Der stechende epigastrische Schmerz ist die Hauptsymptomatik der Ulkuskrankheit. Allerdings zeigt etwa die Hälfte der Patienten mit nachgewiesenem Ulcus duodeni oder ventriculi keinerlei Ulkussymptomatik ((Harrison et al. 1995)).

Als Ursachen für die Ulkuskrankheit gelten:

1. Infektion mit *H. pylori*,
2. Medikamente wie z.B. nicht steroidale Antirheumatika (NSAR),
3. Hypersekretion der Magensäure (z.B. beim Zollinger-Ellison-Syndrom)
4. Anastomoseulkus nach Magenoperation,
5. Tumore
6. systemischer Morbus Crohn.

Die *H. pylori* Infektion gilt als die häufigste Ursache der Ulkuskrankheit. So wird bei fast 100% der Patienten mit Duodenalulkus und bei 80-90% der Patienten mit Magenulkus über einen Nachweis von *H. pylori* berichtet (Vaira, D. et al. 1997).

Das Risiko an einem Duodenalulkus zu erkranken ist für Patienten mit einer Typ-B-Gastritis 10fach erhöht.

Die signifikante Reduzierung eines Ulkusrezidivs und die erfolgreiche Therapie der Ulkuskrankheit (bei Nachweis von *H. pylori*) durch eine medikamentöse *H. pylori* Eradikation gelten als Beweis für die Kausalität von *H. pylori* in der Ulkushäufigkeit.

4.3. Magenlymphom

Magenlymphome gehören zu den Non-Hodgkin-Lymphomen. Nach der Kieler Klassifikation sind sie der Gruppe des monozytoiden Lymphoms oder MALT (mucosa associated lymphatic tissue) Lymphoms zuzuordnen. Die MALT-Lymphome bestehen aus einem neoplastischen Infiltrat zentrozytenartiger und/oder monozytoider B-Zellen, welches das Mucosaepithel durchsetzt, und aus Lymphfollikeln mit reaktiven

Keimzentren, die später verschwinden (Riede-Schäfer 1995). Nach der REAL-Klassifikation (revidierte europäisch-amerikanische Lymphomklassifikation) werden MALT-Lymphome zu den extranodalen Marginalzonen-Lymphomen zugeordnet (Riede-Schäfer 1995, Tumorzentrum Berlin 1998).

MALT-Lymphome machen etwa 7% aller malignen Magentumore aus und etwa 2% aller Lymphome im Gastrointestinaltrakt (Harrison 1995). Der Magen ist jedoch für Lymphome die häufigste Lokalisation außerhalb des Lymphknotens.

Altersgipfel ist das 6. Lebensjahrzehnt. Zur klinischen Symptomatik gehören epigastrischer Schmerz, frühes Sättigungsgefühl und allgemeine Müdigkeit. Prädisponierend sind Läsionen, die mit einer follikulären Hyperplasie des MALT einhergehen (Harrison 1995).

Da lymphatisches Gewebe in der normalen Magenmucosa nicht vorhanden ist, muß es – z.B. durch eine chronische Infektion - erst erworben werden. Untersuchungen konnten zeigen, daß sich Lymphfollikel und lymphatische Aggregate bei einer Infektion mit *H. pylori* bilden (Stolte, M. *et al.* 1989) und daß die Dichte der Gastritis assoziierten lymphozytären Infiltration bei keinem Typ der Gastritis so ausgeprägt ist, wie bei der *H. pylori* Gastritis.

Richtungsweisend für einen Zusammenhang zwischen *H. pylori* Infektion und Magenlymphom waren folgende Befunde. Einmal konnte die Rückbildung eines bereits manifestierten niedrigmalignen Magenlymphoms durch Beseitigung der chronischen *H. pylori* Infektion gezeigt werden (Bayerdorffer, E. *et al.* 1995). Zum anderen konnte in zellbiologischen Untersuchungen gezeigt werden, daß in Zellkultur gebrachte Lymphomzellen aus Gastrektomie-Präparaten durch Zugabe von *H. pylori* aktiviert wurden (Hussel, T. *et al.* 1993). Die Aktivierung war spezifisch für den individuellen *H. pylori* Stamm des Patienten und war abhängig von der Anwesenheit normaler T-Zellen in der Kultur.

4.4. Magenkarzinom

Das Magenkarzinom wird histologisch nach der WHO-Klassifikation in verschiedene Subtypen unterteilt. Es werden das undifferenzierte, das kleinzellige, das adeno-squamöse, das Plattenepithel- und das Siegelringkarzinom unterschieden. Außerdem

wird in der Gruppe der Adenokarzinome der papilläre, tubuläre und der muzinöse Typ unterschieden (Herold, G. 2000).

Nach dem Wachstumsmuster werden in der Laurén-Klassifikation drei unterschiedliche Ausbreitungsformen unterschieden. Der expansiv wachsende und der gut begrenzte intestinale Typ, der infiltrativ wachsende, schlecht begrenzte diffuse Typ und der Mischtyp als Kombination beider zuvor genannter Typen (Herold, G. 2000). 35% der Magenkarzinome liegen im Antrum, 30% in der kleinen Kurvatur, 25% in der Kardia und 10% verteilen sich über den übrigen Magen.

Das Magenkarzinom hat in Deutschland eine Inzidenz von 20 pro 100 000 Einwohner (Herold, G. 2000). Weltweit kommt es am häufigsten in China und Japan vor. Der Altersgipfel liegt jenseits des 50. Lebensjahres. Männer sind fast doppelt so häufig betroffen wie Frauen. Die klinische Symptomatik ist meist diskret und unbestimmt.

Im Zusammenhang mit dem Magenkarzinom wurde *H. pylori* 1994 von der International Agency for Research on Cancer der WHO in die Gruppe I der definitiven Karzinogene eingeordnet (Logan, R. P. 1994; International Agency for Research on Cancer 1994).

Eine exakte Aufklärung der durch *H. pylori* induzierten Karzinogenese steht noch aus. Man geht heute jedoch davon aus, daß *H. pylori* mutagene Effekte auslösen kann und es dadurch über die intestinale Metaplasie zur Dysplasie und zur Entwicklung des Magenkarzinoms kommen kann.

5. Therapie einer *Helicobacter pylori* Infektion

5.1. Indikation zur Therapie einer *Helicobacter pylori* Infektion

Die Indikation zur Therapie einer *H. pylori* Infektion ist gegenwärtig in Teilbereichen noch Gegenstand der Diskussion. Sowohl in Amerika (National Institutes of Health Guidelines 1997) als auch in Europa (The European *Helicobacter* Study Group, 2000) gilt es jedoch als unstrittig, daß bei folgenden Erkrankungen, bei Nachweis von *H. pylori*, die Indikation zur Eradikationstherapie gegeben ist:

1. Ulkuskrankheit (aktiv oder in der Anamnese)
2. MALT Lymphom

Darüber hinaus empfiehlt die European Helicobacter Study Group eine Eradikationstherapie bei atrophischer Gastritis sowie bei Verwandten ersten Grades von Patienten mit Magenkarzinom und *H. pylori* Nachweis. Auch nach der Operation eines Magenkarzinoms wird eine Therapie empfohlen (The European Helicobacter Study Group, 2000).

5.2. Therapieregime

Eine Vielzahl von Therapieregimen zur Eradikation einer *H. pylori* Infektion stehen zur Verfügung. Neben einer Monotherapie (Wismutsalz oder Antibiotikum), einer Dualtherapie (Wismutsalz und Antibiotikum) und einer Quadrupeltherapie (Wismutsalz plus Protonen-Pumpen-Inhibitor (PPI) plus zwei Antibiotika), gibt es unterschiedliche Tripeltherapien. Bei einer Tripeltherapie wird ein PPI, wie z.B. Omeprazol, mit zwei Antibiotika kombiniert. Folgende Kombinationen stehen zur Verfügung:

Italian-Tripel-Therapie: PPI plus Clarithromycin plus Metronidazol

French-Tripel-Therapie: PPI plus Clarithromycin plus Amoxicillin

English-Tripel-Therapie: PPI plus Amoxicillin plus Metronidazol

Die Methode erster Wahl ist die French-Tripeltherapie aus Clarithromycin plus Amoxicillin plus einem Protonenpumpeninhibitor über sieben Tage (The European Helicobacter Study Group, 2000). Alternativ zu Clarithromycin kann auch Metronidazol verabreicht werden (English-Tripel-Therapie).

Mit diesem Therapieregime werden abhängig von der Dosierung der einzelnen Antibiotika Eradikationsraten zwischen 80 und 91% erreicht (Lind, T. *et al.* 1996; MACH-1-Studie; (Metronidazol, Amoxicillin, Clarithromycin, *H. pylori*)).

Dabei hat sich in der Therapie der Ulkuskrankheit gezeigt, daß eine erfolgreiche Eradikation von *H. pylori* neben einer beschleunigten Heilung v.a. zu einer signifikanten Senkung der Rezidivrate geführt hat (Axon, A.T. *et al.* 1997).

Auch bei der Therapie niedrigmaligner MALT-Lymphome hat die Eradikation einer *H. pylori* Infektion zum Teil sogar zur kompletten und längerfristigen Remission des Lymphoms geführt (Bayerdorffer, E. *et al.* 1995).

5.3. Resistenzen

Neben einer erhöhten Anzahl von Nebenwirkungen (im Vergleich zu einer Therapie mit nur einem Antibiotikum plus Protonenpumpeninhibitor) (Bell, G.D. *et al.* 1992) und der damit verbundenen verminderten Patientencompliance stellt v.a. die Entwicklung von Resistenzen von *H. pylori* gegen Antibiotika ein Problem dar. In einer Untersuchung zur Resistenzlage von *H. pylori* bei 188 Patienten wurde bei 2,1% der untersuchten Stämme eine Resistenz gegen Clarithromycin und bei 32% der Stämme eine Resistenz gegen Metronidazol ermittelt (Kist, M. 1991).

Bei primären Therapieversagern erhöhte sich allerdings die Resistenzlage gegenüber Clarithromycin bei einer Untersuchung 58% bzw. 49% und gegenüber Metronidazol auf 75% bzw. 66% (Heep, M. *et al.* 2000).

Für den klinischen Alltag von Bedeutung ist dabei v.a. die Resistenz gegen das Antibiotikum Clarithromycin. So sinkt die Eradikationsrate bei Clarithromycinresistenz von *H. pylori* auf insgesamt 55% (Dore, M. P. *et al.* 2000), was einer Verminderung der Therapieeffizienz um ungefähr 30-40% entsprechen würde.

Houben, M.H. *et al.* gehen in einer Metaanalyse verschiedener Studien sogar von einer durchschnittlichen Verminderung des Therapieerfolgs um 56% bei Clarithromycinresistenz aus (Houben, M.H. *et al.* 1999).

Clancy R. *et al.* konnten in einer Analyse verschiedener Studien zeigen, daß es zu einer deutlichen Zunahme der Resistenz gegenüber Clarithromycin gekommen ist. So wurden im Zeitraum zwischen 1985 und 1990 durchschnittlich 0-2% primäre Resistenzen gefunden, während es im Zeitraum zwischen 1995 und 2000 bereits zwischen 8 und 15% primäre Resistenzen von *H. pylori* gegenüber Clarithromycin waren. Besorgniserregend war auch die Zunahme sekundärer Resistenzen (Resistenzen, die unter Therapie entstanden sind) auf bis zu 25% in einer amerikanischen Studie in einem Zeitraum von nur drei Jahren (Clancy R. *et al.* 2000).

Bei einer alleinigen Metronidazol-Resistenz kann mit der beschriebenen Tripeltherapie immerhin noch eine Eradikationsrate von 75% erreicht werden (Megraud, F. *et al.* 1998).

Liegt allerdings eine Resistenz sowohl gegen Clarithromycin als auch gegen Metronidazol vor, so scheint eine erfolgreiche Eradikationstherapie schwierig bis unmöglich zu sein (De Boer, W. A. 2000).

6. Ökonomische Aspekte einer *Helicobacter pylori* Therapie

Die Kosten einer Eradikationstherapie liegen etwa im Bereich von 135 DM und 265DM. Im Vergleich dazu kostet eine Schluckimpfung mit Typhoral®, dem Vektor des hier beschriebenen Impfstammes 38.23DM. Durch eine Impfung zur Eradikation einer *H. pylori* Therapie könnten also die Kosten um das 3.5 bis 6.9 fache reduziert werden. Ein protektiver Impfstoff könnte zusätzlich Kosten vermeiden, indem die Inzidenzen und damit die direkten und indirekten Kosten *H. pylori* assoziierter Krankheiten vermindert werden könnten.

Rupnow *et al.* gehen sogar davon aus, daß die Entwicklung und der Gebrauch eines Impfstoffes gegen *H. pylori* mehr Vorteile für das Gesundheitswesen bringen würde als herkömmliche Impfstoffe wie z.B. der Impfstoff gegen Hepatitis B (Rupnow, M. F. *et al.* 1999).

Die Schwierigkeiten bei primärem Versagen der Eradikationstherapie, die in den meisten Ländern zunehmenden Antibiotikaresistenzen von *H. pylori* (Graham, D. Y 1998), der hohe Verbreitungsgrad von *H. pylori*, der eine flächendeckende Therapie mit Antibiotika unmöglich macht und die zu erwartenden Einsparungen durch den Einsatz einer Vakzine haben bereits früh zu Bemühungen um die Entwicklung eines Impfstoffes geführt. Zusätzlich bietet die Entwicklung eines effizienten Impfsystems nicht nur eine alternative Therapie gegen *H. pylori*, sondern gegen Infektionen im Gastrointestinaltrakt allgemein.

7. Impfstoff

Bei den gebräuchlichen Impfstoffen zur aktiven Immunisierung lassen sich hauptsächlich zwei Prinzipien unterscheiden. Erstens die aktive Immunisierung mit einem attenuierten oder inaktivierten bakteriellen oder viralen Impfstoff. Beispiele hierfür sind die Impfstoffe gegen Masern, Mumps, Röteln oder Tuberkulose. Zweitens die Verwendung von Impfstoffen aus gereinigten oder synthetischen Antigenen, wie z.B. der Kombinations-Impfstoff gegen Diphtherie, Pertussis, Tetanus.

H. pylori gelingt es allerdings, trotz nachgewiesener Stimulation der Immunantwort des Wirtes, im Magen zu persistieren. Ein Impfstoff gegen *H. pylori* hat damit die Aufgabe, die Immunantwort so zu modifizieren, daß ein wirksamerer Schutz gegenüber einer

Infektion mit *H. pylori* entsteht (prophylaktische Impfung), bzw., daß es dem menschlichen Immunsystem gelingt eine bereits bestehende *H. pylori* Infektion zu eliminieren (therapeutische Impfung).

Die meisten Studien zur Entwicklung von therapeutischen oder prophylaktischen Impfstoffen gegen *H. pylori* wurden in Tiermodellen durchgeführt. Als die hier beschriebene Studie stattfand, gab es erst zwei Publikationen von Humanstudien (s. u.), zwei weitere Humanstudien wurden nach Abschluß der hier beschriebenen Studie veröffentlicht (s. Diskussion).

7.1. Impfstudien an Tieren

Helicobacter-Impfstudien wurden an unterschiedlichen Tieren unter Verwendung unterschiedlicher Impfantigene durchgeführt. Das meistgebrauchte Tiermodell ist dabei die Maus.

Impfungen wurden mit einem Impfantigen allein (Michetti, P. *et al.* 1994), mit Impfantigen in Kombination mit einem stimulierendem Adjuvans (Ferrero, R. L. *et al.* 1995) und mit *H. pylori*-Antigene exprimierenden, attenuierten *Salmonellen* durchgeführt (Gómez-Duarte, O. G. *et al.* 1998). Alternativ wurde auch eine DNA Vakzinierung unternommen (Miyashita, M. *et al.* 2002).

Als Impfantigen wurden z.B. Urease (Michetti, P. *et al.* 1994), Katalase (Radcliff, F. J. *et al.* 1997), Hitzeschockproteine (Ferrero, R. L. *et al.* 1995), VacA (Marchetti, M. *et al.* 1995) u.a. verwendet.

Das Cholera Toxin, das Hitze labile Enterotoxin von *E. coli* aber auch Aluminium Hydroxid dienten u.a. als Adjuvans (Del Giudice, G. *et al.* 2001).

Die Arbeit von Michetti *et al.*, Ferrero *et al.* und Gómez-Duarte *et al.* sollen exemplarisch für die Vielzahl von Untersuchungen im Tiermodell vorgestellt werden. Alle drei Autoren führten Ihre Studien an Mäusen durch und verwendeten als Impfantigen Urease von *H. pylori*.

Michetti *et al.* immunisierten BALB/c Mäuse mit Urease (rekombinant und nativ). Nach der Impfung wurden die Mäuse mit *Helicobacter felis* infiziert.

Es konnte gezeigt werden, daß, im Vergleich zur ungeimpften Kontrollgruppe, signifikant weniger geimpfte Mäuse eine Kolonisation des Magens mit *Helicobacter*

felis aufwiesen. Dies zeigte, daß Mäuse durch die orale Immunisierung mit Urease von *H. pylori* gegenüber einer Infektion mit *Helicobacter felis* geschützt werden, und daß beide Urease- Untereinheiten (A und B) protektive Epitope enthalten. Allerdings war die Rate der Protektion relativ gering (60% Protektion nach 70 Tagen bei Impfung mit Ureaseuntereinheit A und 80% Protektion bei Impfung mit Ureaseuntereinheit B) (Michetti, P. *et al.* 1994).

Ferrero *et al.* verabreichten als Impfstoff eine Kombination aus Hitzeschockprotein und Urease. Das Hitzeschockprotein diente hierbei als Adjuvans, das die Immunreaktion gegen die Urease verstärken sollte. Mit diesem Modell wurde eine hundertprozentige Protektion gegenüber einer anschließenden Infektion der Mäuse mit *Helicobacter felis* erzielt (Ferrero, R. L. *et al.* 1995).

Ebenfalls eine hundertprozentige Protektion gegenüber einer Infektion mit *H. pylori* erreichten Gómez-Duarte *et al.* durch Impfung von Balb/c Mäusen mit einem *Salmonella typhimurium* Stamm, der die Urease Untereinheiten A und B exprimierte. (Gómez-Duarte, O. G. *et al.* 1998). *Salmonella typhimurium* wurde dabei als Vektor oder Adjuvans verwendet, um die Immunantwort gegen Urease zu verstärken. Basierend auf der Arbeit von Gómez-Duarte *et al.* wurde das Impfmodell am Menschen entwickelt, das in dieser Arbeit vorgestellt wird.

7.2. humane Impfstudien

Die Arbeiten von Kreiss *et al.* und Michetti *et al.* waren die einzigen humanen Impfstudien, die zum Zeitpunkt der Entwicklung unseres Impfstoffes veröffentlicht waren. Während der Auswertung unserer Ergebnisse wurden zwei weitere Studien (Di Petrillio *et al.* und Angelakopoulos *et al.*) publiziert, die in der Diskussion zu dieser Arbeit besprochen werden.

Kreiss *et al.* führten eine klinische Phase I Studie mit Verabreichung von rekombinanter Urease an Erwachsenen mit asymptomatischer *H. pylori* Infektion durch (Kreiss, C. *et al.* 1996). Eine Wirksamkeit dieses Impfstoffes gegenüber der *H. pylori* Infektion konnte nicht festgestellt werden. Die Ursache hierfür liegt sicherlich darin, daß die Immunantwort des Wirtes auf die Urease nicht mit Hilfe eines Adjuvans so verstärkt bzw. modifiziert wurde, daß die Elimination der *H. pylori* Infektion möglich wurde.

Michetti *et al.* verabreichten in einer Plazebo kontrollierten Studie Urease von *H. pylori* zusammen mit hitzelabiles Enterotoxin (LT) von *Escherichia coli* an insgesamt 26 Probanden. LT wurde dabei als Adjuvans verwendet. In dieser Studie sollte die Wirksamkeit einer therapeutischen Vakzinierung evaluiert werden. Deshalb waren alle Probanden zum Zeitpunkt der Studie *H. pylori* positiv, allerdings zeigten sie keine klinischen Symptome. Bei allen Probanden der Verum-Gruppe konnte eine dosisabhängige Zunahme der anti-Urease Serum IgA (Elisa-Test) und der IgA-produzierenden B-Zellen (B-Zell-Elispot) festgestellt werden, was zu einem signifikanten Abfall der Bakteriendichte im Magen der Probanden führte. Eine Eradikation der *H. pylori* Infektion konnte bei keinem der Probanden festgestellt werden und bei 62,5% der Probanden wurde als Nebenwirkung Diarrhö beobachtet (Michetti, P *et al.* 1999).

In den vorgestellten Studien gelang es also nicht, einen wirksamen und nebenwirkungsarmen Impfstoff gegen *H. pylori* zu entwickeln. Basierend auf diesen Daten entschied sich unserer Gruppe für die Entwicklung eines Impfstoffes der die beiden Prinzipien bisheriger Impfmodelle –attenuierter Organismus und aufgereinigtes Antigen- vereinigt. Dazu wurde ein attenuierter Organismus verwendet, der als Vektor dient. Dieser Organismus exprimiert ein Fremdanigen gegen das die Immunantwort induziert, modifiziert oder verstärkt werden soll.

Die Vorteile dieses Systems sind:

1. Antigen und Adjuvans sind aneinander gekoppelt
2. durch den Vektor wird das Fremdanigen dem Immunsystems des Wirtes zugänglicher gemacht
3. durch die Antigenstrukturen des Vektors wird die Immunantwort gegen das Fremdanigen verstärkt. Der Vektor dient dabei als Adjuvans.
4. durch die spezifischen Eigenschaften des Vektors kann die Immunantwort gegen das Fremdanigen modifiziert werden.

Als Antigen wurde Urease von *H. pylori* benutzt, als Vektor *Salmonella typhi* (*S. typhi*) Ty21a.

7.3. Urease als Antigen

Es gibt mehrere Punkte, die für das von *H. pylori* produzierte Enzym Urease als Antigen zur Impfstoffentwicklung sprechen.

1. Das Enzym Urease ist hoch konserviert, d.h. Urease liegt sowohl in verschiedenen Stämmen von *H. pylori* als auch in verschiedenen Spezies von *Helicobacter* stets in derselben Form vor und muß somit für die Spezies *Helicobacter* eine wichtige Rolle spielen (Dunn, B. E. *et al.* 1990; Hu, L. T. *et al.* 1990).
2. Das Enzym Urease befindet sich an der Oberfläche des Bakteriums oder wird von diesem sezerniert und ist damit der Immunantwort des Wirtes zugänglich (Mobley, H. T. L. *et al.* 1995).
3. Wie oben bereits beschrieben, ermöglicht die Urease *H. pylori* die Kolonisation im sauren Milieu des Magens und ist damit als wichtiger Virulenzfaktor für *H. pylori* anzusehen (Solnick, J. V. *et al.* 1995; Segal, E. D. *et al.* 1992).
4. Eine Protektion gegen eine *H. pylori* Infektion durch Immunisierung mit Urease im Mausmodell konnte bereits 1994 nachgewiesen werden (Michetti, P. *et al.* 1994).

Eine Immunisierung gegen Urease als Antigen könnte somit einen effektiven Schutz gegen eine Infektion mit *H. pylori* darstellen bzw. eine alternative Therapiemöglichkeit gegen eine bereits bestehende *H. pylori* Infektion sein.

7.4. Salmonella typhi als Adjuvans

Als Adjuvans für die Impfung beim Menschen bietet sich der Salmonellenstamm Ty21a an. Ty21a wird weltweit als Impfstoff gegen Typhus eingesetzt. Es handelt sich dabei um *S. typhi*, Stamm Ty21a Berna, der von der Firma Chiron Behring GmbH & Co unter dem Handelsnamen Typhoral L vertrieben wird.

Die Verwendung von Ty21a als Adjuvans und Vektor für Fremdartigene hat dabei folgende Vorteile:

1. Die orale Verabreichung ermöglicht eine leichte Handhabung des Impfstoffes
2. Die breite Immunantwort, die durch diesen Impfstamm induziert wird, beinhaltet sowohl humorale (sekretorisches IgA, Serum IgM/A/G) als auch die zellvermittelte (spezifische T-Zellen) Bestandteile (Viret, J. F. *et al.* 1999).

3. Die langjährigen Erfahrungen mit dem Impfstamm sind in einer Vielzahl von Untersuchungen über Immunogenität und Toxizität dokumentiert. Eine Metaanalyse von insgesamt 17 Studien über Effektivität und Toxizität dieser Vakzine bei insgesamt 1866951 Personen ergab, daß im Anschluß an die Impfung als Nebenwirkungen v.a. leichter Durchfall (5,1% der Personen), Erbrechen (2,1% der Personen) und erhöhte Temperatur (2% der Personen) auftraten (Engels, A. *et al.* 1998). Die kumulative drei-Jahres Effektivität betrug 51% für *S. typhi* Ty21a.
4. Schwere Nebenwirkungen wurden selbst bei Verabreichung von 10^{11} Lebendorganismen nicht verzeichnet (Gilman, R. H. *et al.* 1977).
5. Die Methoden zur genetischen Manipulation von *S. typhi* sind bekannt und erprobt. So können Plasmid-Vektoren, die für den Gebrauch in *Escherichia coli* entwickelt wurden, generell auch für Salmonellen benutzt werden (Levine, M. M. *et al.* 1990). Es existieren Methoden um diese Plasmide zu stabilisieren (Nakayama, K. *et al.* 1988) und Techniken, um fremde DNA in das Chromosom von *Salmonella typhi* zu integrieren, sind verfügbar (Hone, D. *et al.* 1988).
6. Der Einsatz von *S. typhi* Ty21a als Adjuvans und „carrier“ für Fremdproteine wurde bereits in mehreren Studien evaluiert. *S. typhi* Ty21a diente hierbei als Carrier und Adjuvans für Antigene von *Vibrio cholerae*, *Streptococcus mutans*, *Shigella sonnei*, *Escherichia coli*, *Mycobacterium leprae*, *Plasmodium falciparum*, *Francisella tularensis*, *Schistosoma mansoni* und *Hepatitis-B-Virus* (Levine, M. M. *et al.* 1990; Herrington, D. A. *et al.* 1990; Tacket, C. O. *et al.* 1997).

Die relativ geringe Wirksamkeit, die sich in der oben erwähnten Metaanalyse ergab, hängt v.a. damit zusammen, daß unterschiedliche Verabreichungsschemata benutzt wurden. So wurde bei Verwendung von in Bikarbonat suspendierten Lebendorganismen als Impfstoff eine Wirksamkeit von 96% ermittelt (Untersuchung in Ägypten 1982 an 16 486 Personen) während bei der Verwendung von sog. „enteric coated capsule“ nur eine Wirksamkeit von 16% erreicht wurde (Untersuchung in Chile 1990 an 27 618 Personen) (Engels, A. *et al.* 1998). In einem direkten Vergleich in einer Untersuchung in Chile konnten diese Ergebnisse bestätigt werden. Hier konnte mit der Suspension eine Protektion von 77% erreicht werden, während die von sog. „enteric coated capsule“ nur eine Protektion von 33% erzielten (Levine, M. M. *et al.* 1990).

Trotz der in der Metaanalyse ermittelten geringen Wirksamkeit dieses Lebendimpfstoffes wird eine Verwendung im Rahmen des Public Health Programms zur Kontrolle des Typhus diskutiert (Ivanoff, B. *et al.* 1994).

8. Fragestellung

Aufbauend auf den Ergebnissen von Gomez und Duarte *et al.* (Gòmez-Duarte, O. G. *et al.* 1998) war der nächste Schritt die Erprobung dieses Impfstoffes aus *S. typhi* Ty21a als Vektor und Urease von *H. pylori* als Antigen am Menschen. Die von uns konzipierte Untersuchung hatte dabei zum Ziel, die Verträglichkeit und Immunogenität des Impfstoffes *S. typhi* Ty21a(pDB1) zu beurteilen. Dazu wurde der Impfstoff an 12 gesunde Probanden verabreicht und mittels immunologischer Untersuchungen die Immunantwort des menschlichen Organismus auf diesen Impfstoff überprüft und durch klinische Beobachtung und hämatologischer Untersuchungen die Nebenwirkungen beobachtet.

Im einzelnen sollten durch diese Untersuchung folgende Fragestellungen gelöst werden:

1. Führt die Verabreichung des rekombinanten Impfstoffes zu qualitativ oder quantitativ veränderten Nebenwirkungen im Vergleich zum Nebenwirkungsprofil des Vektors?
2. Kommt es durch den Kontakt zwischen Impfstoff und Organismus des Wirtes zu Veränderungen des Impfstoffes, kommt es also im Kontakt mit der Mucosa oder dem Immunsystems des Menschen zu Veränderungen der Plasmidstabilität?
3. Läßt sich durch diesen Impfstoff eine meßbare Stimulation des Immunsystems als Reaktion sowohl auf den Vektor als auch auf das Fremdanigen detektieren, lassen sich also die Ergebnisse der Studien im Tiermodell (Gòmez-Duarte *et al.*) auf das humane System übertragen?
4. Wie sieht das Profil der Immunantwort aus? Läßt sich durch die Verwendung des Impfstoffes eine zelluläre Immunantwort gegen Urease induzieren?

II Material und Methoden

1. Material

1.1. Antigene

1.1.1. Urease

Native Urease (Untereinheit A und B), gewonnen aus *H. pylori* Lysaten, und rekombinante Urease (Untereinheit B), gewonnen aus Lysaten von rekombinanten *Escherichia coli* Bakterien, wurden dazu verwendet, um im T-Zell-Elispot, im B-Zell-Elispot, dem Proliferationsassays und im enzyme-linked immunosorbent assay (Elisa) eine spezifische Antwort gegen native und rekombinante Urease zu ermitteln.

Die Aufreinigung aus den Lysaten wurde von Robert Hurwitz (Proteinservicegruppe, Max Planck Institut für Infektionsbiologie) vorgenommen und soll hier nur kurz skizziert werden.

1.1.1.1. Native Urease

Die *H. pylori*-Bakterien des Stammes P76 wurden zuerst in 40 mM Phosphatpuffer, pH 7,6, 1 mM EDTA suspendiert und dann mittels French Press (2 x 20.000psi) lysiert.

Die im Lysat gelöste Urease wurde ca. 100fach durch Q-Sepharose-Chromatographie angereichert und weiter gereinigt durch eine MonoQ-FPLC (Pharmacia) Säule.

Elution erfolgte durch linearen NaCl-Gradienten in 40 mM Phosphatpuffer, 1mM EDTA.

Die Fraktionen mit der höchsten Urease-Aktivität wurden gepoolt, konzentriert durch Ammoniumsulfat Präzipitation und weiter aufgereinigt durch Gel-Filtration auf einer Superdex 200 HR26/60 Säule (Pharmacia) in Phosphat buffered saline (PBS)/1mM EDTA

Die Aktivität der Urease wurde mittels phenol red assay bestimmt, wie bei Hamilton-Miller und Gargan beschrieben (Hamilton-Miller, J. M. *et al.* 1979).

Mittels Limulus Amebocyte Lysate Assay wurde die Konzentration an Endotoxin mit 150 ng/mg Urease ermittelt

1.1.1.2. Rekombinante Urease

Die Urease Untereinheit B wurde in *Escherichia coli* Bakterien überexprimiert, so daß das rekombinante Protein mittel 8M Urea von Einschlusskörperchen extrahiert werden

mußte. Die Aufreinigung erfolgte durch nickel-nitrilotriacetic acid metal affinity chromatography (Qiagen) unter denaturierenden Bedingungen. Die eluierten Proteine wurden durch Dialyse gegen PBS zurückgefaltet und durch Gel Filtration Chromatographie auf einer Superose 12Hr10/30 Säule (Pharmacia) gereinigt.

Die Endotoxin Konzentration wurde mit 120 ng/ml wie oben beschrieben ermittelt.

1.1.2. andere Antigene und Reagenzien

Salmonellen-O-Antigen	Sifin; Nr.: TS 1602
Salmonellen-H-Antigen	Sifin; Nr.: TS 1603
Salmonellen-LPS	Sigma; Nr.: L-2375
Tetanustoxin	Chiron Behring; Nr.: 00HG005
<i>Escherichia coli</i> LPS	Proteinservicegruppe MPI, Berlin
Protein GroEl	Proteinservicegruppe MPI, Berlin
PHA-L	Sigma; Nr.: L-4144
ConA	Sigma; Nr.: C-5275
Hybrimax	Sigma; Nr.: A-4668
Gentamycin	Invitrogen; Nr.: 15710-049
Streptomycin	Fluka; Nr.: 85880
Interleukin 2	Tebu; Nr.: 200-02
[³ H] Thymidin	Amersham; TRK 637

1.2. Antikörper

Anti-Human-IgG	Sigma; Product No.: I-8010
Biotin- SP-conjugated Anti-Human-IgG, M, A	JIR; Code: 309-065-003
Anti human IFN- γ	R&D Systems; Nr.: MAB 285
Biotinylierter Anti human IFN- γ	R&D Systems; Nr.: BAf 285
Peroxidase conjugated anti-Human IgG (H+L)	JIR; Nr.: 309-035-082
Anti human IFN- γ	Biosource; Nr.: 58.123.08
Biotinylierter Anti human IFN- γ	Biosource; Nr.: 58.123.02

1.3. Lösungen

RPMI 1640 Medium	Gibco; Nr.: 21875-034
Phosphat buffered saline (PBS)	Sigma; Nr.: L-8754
FICOLL-Separation-Solution	Biochrom KG; Nr.: L 6115
Human Serum AB	PAA; Nr.: C15-021
Bovine Serum Albumin (BSA)	SERVA; Nr.: 47321
Schwefelsäure	Max Planck Institut Berlin
Phosphatase - konjugiertes Streptavidin	Dianova, Nr.: 016-030-084
BCIP/NBT buffered Substrat Tabletten	Sigma, Product No. B5655

Substratlösung (Elisa)

TMB Peroxidase Substrate	Kirkegaard Pery, Nr.: 50-76-01
Peroxidase Solution B (H ₂ O ₂)	Kirkegaard Pery, Nr.: 50-65-00

Carbonatpuffer (Elispot Coating buffer)

NaHCO₃ 2,93g

Na₂CO₃ 1,5g

ad 1l Aqua dest.; entspricht: 0,05M Carbonate pH 9,6) (Wien)

Blocking buffer

3% BSA (B-Zell-Elispot)

oder 1% BSA (T-Zell-Elispot)

ad 1l PBS

Waschlösung

0.05 % Tween

ad 1l PBS

Standard Diluent

PBS

0,5% BSA

0,1% Tween

1.4. weitere Materialien und Reagenzien

SARSTEDT-Monovetten

Neubauer-Zählkammer

Kryotubes

NUNC™ Kryotubes

Soja(Merck)-LB Medien

Max Planck Institut Berlin

LB Agar

Life technologies; Nr.: 22700-025

Zentrifuge

Kendro Lab. Product

96 well NUNC Platte

NUNC™ Brand Product

Brutschrank

NUAIRE™ US Autoflow

Microbeta scintillation counter

Packard topcount

Cellulose-ester-membrane-bottomed

MultiScreen®

Platten

Elisa-Waschgerät

TECAN

Elispot-Reader

Bioreader®, Bio-Sys GmbH

Elisa-Reader

SpectraMax 250, Molecular Devices

1.5. Charakterisierung des Kontrollstammes *Salmonella typhi* Ty21a

Der Salmonellenstamm *S. typhi* Ty21a ist eine Mutante des pathogenen Stammes *S. typhi* Ty2. Er gehört nach dem Kauffmann-White-Schema zur Gruppe D1 mit den O-Antigenen 9,12. Ty21a entstand durch Behandlung von Ty2 mit N-methyl-N'-nitro-N-nitroguanidin und anschließender Selektion der Vi⁻ Mutante.

Ein Charakteristikum von *S. typhi* Ty21a ist der Mangel an UDP-Galaktose-4-Epimerase. Als Folge davon kann die Biosynthese ganzer Zellwand-Lipopolysaccharide nur unter Bedingungen stattfinden, die gleichzeitig zu einer Lyse und Inaktivierung des Bakteriums durch Anhäufung toxischer Mengen an Galaktose-1-Phosphat und UDP-galaktose führen (Gilman, R. H. *et al.* 1977).

Unter physiologischen Bedingungen beim Menschen kann *S. typhi* Ty21a als lebender Organismus fast nie länger als einen Tag, jedoch niemals länger als zwei bis drei Tage nach Verabreichung im Stuhl nachgewiesen werden.

Dies macht *S. typhi* Ty21a zum Modell eines Vektors für Fremdantigene, der durch eine kurz andauernde Infektion zwar eine Immunantwort garantiert, durch die Autolyse nach spätestens drei Tagen aber keine Infektion hervorruft.

Neben der UDP-galaktose-4-epimerase sind noch andere Enzyme des Galaktosestoffwechsels in ihrer Aktivität vermindert. Die Galaktose-Permease ist um 50%, die Galaktose-1-Phosphat-Uridyl-Transferase um 35% und Galaktokinase um 15% in ihrer Aktivität vermindert. Dies hat zur Folge, daß Galaktose nicht verstoffwechselt werden kann und so bereits eine Konzentration von 0,1% Galaktose im Nährmedium zur Lyse des Bakteriums führt. Nur in Anwesenheit von Galaktose ist *S. typhi* Ty21a zur LPS-Bildung fähig, was die Immunantwort des Wirtes aktiviert. Dieses LPS wird smooth-type LPS genannt. Ohne Galaktose im Nährmedium ist Ty21a zwar fähig zu wachsen, es wird dann aber nur sog. rough-type LPS gebildet, welches die Immunantwort des Wirtes nicht oder nur in geringem Maße aktiviert.

S. typhi Ty21a ist ein stabiler Doppelmutant. Reversionen wurden weder bei Wachstum *in vitro* noch bei Wachstum *in vivo* beobachtet (Germanier und Furer 1983).

1.6. Charakterisierung des Impfstammes *Salmonella typhi* Ty21a(pDB1)

Der Impfstamm *S. typhi* Ty21a(pDB1) basiert auf dem oben bereits beschriebenen Ausgangsstamm *S. typhi* Ty21a. Zuerst wurde nach der Methode von Morona *et al.* eine thyminabhängige Spontanmutante von *S. typhi* Ty21a selektiert (Morona, R. *et al.* 1991). Der resultierende Stamm hat die Bezeichnung Ty21a thyA. Als nächster Schritt wurde in Ty21a thyA ein Plasmid integriert, welches den genetischen Code zur Expression von Urease und zur Produktion von Thymidilat Synthase trägt. Dieses Plasmid wurde durch Modifikation des Urease-Expressionsplasmids pYZ97 (Gomez-Duarte, O. G. *et al.* 1998) gewonnen. Diesem Expressionsplasmid wurde das Beta-Lactamase-Gen, das eine Resistenz gegen Ampicillin vermittelt, vollständig deletiert und das Thymidilat-Synthase-Gen aus *Escherichia coli* K12 eingesetzt (Belfort, M. *et al.* 1983). Das resultierende Plasmid „pDB1“, das in den Salmonellenstamm Ty21a thyA

integriert wurde, komplementiert die Thymidinabhängigkeit von Ty21a thyA. Der resultierende Stamm mit Expression von Urease und ohne Thymidinabhängigkeit bzw. bekannter Antibiotikaresistenz trägt die Bezeichnung Ty21a(pDB1).

Als Nachweis zur Identität des Trägerstammes wurden folgende Qualitätskontrollen verwendet:

1. Der Impfstamm *S. typhi* Ty21a(pDB1) wurde mit dem Ausgangsstamm *S. typhi* Ty21a und weiteren im Labor verwendeten Bakterienstämmen (*Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*) durch random primed PCR (Polymerase Chain Reaction) und anschließender Auftrennung über Polyacrylamid-Gelelektrophorese verglichen. Das Bandenmuster war identisch zwischen *S. typhi* Ty21a(pDB1) und *S. typhi* Ty21a und unterscheidet sich vom Bandenmuster von *Escherichia coli* und *Salmonella enteritidis* bzw. *typhimurium*.
2. Die Antibiotikaresistenz des Impfstammes gegenüber im Labor verwendeten Antibiotika wurde überprüft. Antibiotikaresistenzen, bei denen *S. typhi* Ty21a und *S. typhi* Ty21a(pDB1) halbmaximal wachsen unterschieden sich höchstens um den Faktor 1,5.
3. Die Galaktosesensitivität von *S. typhi* Ty21a und *S. typhi* Ty21a(pDB1) wurde über Aufzucht auf Minimalmedium (M9 mit Zusätzen von Casein-Hydrollysat, Vit B1 und Tryptophan) nachgewiesen. Eine Zugabe von 0,1% Galaktose zum Medium verhinderte das Wachstum von *S. typhi* Ty21a und *S. typhi* Ty21a(pDB1).
4. Das Plasmid pDB1 wurde über eine Silica-Säule aufgereinigt und die Identität dieses Plasmids über Restriktionskartierung und PCR mit Urease-spezifischen Primern nachgewiesen.
5. Die Expression der Urease Einheiten A und B wurde über Gelelektrophorese nachgewiesen. Die Identität der Ureaseeinheit B wurde auf einem Western Blot mit Hilfe eines Urease-spezifischen Kaninchen-Serums nachgewiesen.
6. Die Stabilität der Expression der Urease Untereinheiten A und B wurde mit SDS-Gelelektrophorese von vier aufeinander folgenden Übernachtskulturen mit jeweils 10000-facher Verdünnung gezeigt. Die Expression war über vier Passagen stabil.

2. Methoden

2.1. Aufbau der klinischen Studie zur Untersuchung eines rekombinanten Impfstoffes gegen *Helicobacter pylori* am Menschen

Für die Untersuchung wurden 12 Probanden ausgewählt. Sechs der Probanden waren Frauen und sechs Männer. Die Probanden waren zum Zeitpunkt der Impfung „gesund“ im Sinne von nicht klinisch auffällig. Alle 12 Probanden wurden einer Voruntersuchung unterzogen, die die Anamnese und körperliche Untersuchung sowie die Bestimmung hämatologischer und klinisch-chemischer Blutparameter beinhaltete. Im einzelnen wurden folgende Werte untersucht:

Hämatologische Parameter:	1. Hämoglobin-Konzentration 2. Hämatokrit 3. Mean corpuscular volume (MCV) 4. Mean corpuscular hemoglobin concentration MCHC 5. Leukozyten 6. Thrombozyten
Gerinnungsparameter:	7. Thromboplastinzeit (Quick) 8. International norm ratio (INR) 9. Partielle Thromboplastinzeit (PTT)
Elektrolyte:	10. Natrium 11. Kalium
Leberwerte:	12. Gesamtbilirubin 13. Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT) 14. Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) 15. Gamma-Glutamyl-Transferase (γ -GT) 16. Alkalische Phosphatase (AP)
Ausscheidungsparameter:	17. Harnsäure 18. Serumkreatinin
Pankreaswerte:	19. Lipase und Amylase
Entzündungsparameter:	20. C-reaktives-Protein (CRP)

Keiner der Proband hatte zuvor eine Infektion mit *S. typhi* oder *Salmonella typhimurium* oder mit *H. pylori*. Nur zwei der Probanden, Proband Nr. 2 und 5, hatten eine Impfung mit Typhoral® (*Salmonella enterica*, Serovar *typhi* Ty21a) erhalten. Eine Infektion mit *H. pylori* wurde durch einen kommerziellen Elisa (Vita Diagnostika GmbH, Freiburg) ausgeschlossen. Der Ausschluß einer akuten Infektion wurde durch den [¹³C] Harnstoff Atem Test (IRIS, Wagner Analysentechnik, Bremen) erbracht. Die StudienteilnehmerInnen waren zum Zeitpunkt der Studie nicht schwanger.

Das Alter der Probanden lag zwischen 19 und 34 Jahren mit einem durchschnittlichen Alter von 25,5 Jahren.

2.1.1. Einschußkriterien:

1. Alter zwischen 18 bis 50 Jahren
2. Schriftliches Einverständnis zur Teilnahme an der Studie

2.1.2. Ausschlußkriterien

Folgende Personen werden nicht in die Studie aufgenommen:

1. Personen mit anamnestischen Hinweisen auf eine Überempfindlichkeit gegenüber einem der Inhaltsstoffe der Prüfsubstanz oder chemisch verwandten Substanzen.
2. *H. pylori* Infektion in der Anamnese
3. Antibiotikaallergie
4. Schwangerschaft bzw. Verdacht auf Gravidität
5. Erkrankung der Gallenblase in der Anamnese

2.1.3. Studienmedikation und Gruppeneinteilung

Nach einer zufälligen Verteilung (double blind) bekamen Probanden den Urease

Untereinheit A und B exprimierenden attenuierten Stamm *S. typhi* Ty21a(pDB1) (Impfstamm) oder den attenuierten Stamm *S. typhi* Ty 21a (Kontrollstamm) geimpft. Ty21a ist der herkömmliche Impfstoff gegen Typhus und diente in dieser Studie als Kontrollvariable. Erst nach Auswertung der Ergebnisse wurde die Verteilung Kontrolle versus Verum bekannt gegeben. Die Verteilung war wie folgt: Probanden 1, 6, 9 bekamen den Kontrollstamm *S. typhi* Ty 21a, Probanden 2-5, 7, 8 und 10-12 den Impfstamm (Verum) *S. typhi* Ty21a(pDB1).

Sowohl *S. typhi* Ty21a(pDB1) als auch *S. typhi* Ty21a wurden als lebende Organismen in Form einer Schluckimpfung verabreicht.

Jede Impfdosis sollte aus 10^{10} frisch geernteten lebenden Organismen bestehen, die in 30ml einer 1,3 % Bicarbonatlösung suspendiert wurden.

Die Verabreichung des Impfstoffes (Impf- oder Kontrollstamm) fand am 28.02.2000 (Tag 0), 01.03.2000 (Tag 2) und am 03.03.2000 (Tag 4), zwischen 9 und 12 Uhr statt. Die Probanden mußten für mindestens 90 Minuten keine feste oder flüssige Nahrung zu sich genommen haben. Vor der Verabreichung *S. typhi* Ty21a(pDB1) und *S. typhi* Ty21a wurden 120ml einer 1,3%igen Bicarbonat-Lösung verabreicht. Bicarbonat neutralisiert die Magensäure. Damit wurde gewährleistet, daß eine relativ höhere Zahl der Bakterien lebendig das Duodenum erreicht.

Verträglichkeitsstudie, Aufzucht und Verabreichung von *S. typhi* Ty21a(pDB1) und *S. typhi* Ty21a fand an der Universitätsklinik Freiburg, chirurgisch Abteilung, Prof. Dr. Dr. von Specht statt.

2.1.4. immunologische und mikrobiologische Untersuchungen

Die humorale Immunantwort gegen den Impfstamm *S. typhi* Ty21a(pDB1) und den Kontrollstamm *S. typhi* Ty21a wurde mittels B-Zell-Elispot und Elisa untersucht.

Die zelluläre Immunantwort gegen den Impfstamm *S. typhi* Ty21a(pDB1) und den Kontrollstamm *S. typhi* Ty21a wurde mittels T-Zell-Elispot, Proliferationsassay und IFN- γ Elisa untersucht.

Serum für den Elisa und periphere Blut mononukleäre Zellen (PBMZ) für den B- und T-Zell-Elispot sowie den Proliferationsassay und den IFN- γ Elisa wurden aus dem heparinisiertem Vollblut der Probanden gewonnen.

Heparinisiertes Vollblut wurde an den Tagen 0, 7, 14 und 28 abgenommen. Hierbei wurde der erste Tag der Verabreichung als Tag 0 festgelegt.

Die experimentellen Untersuchungen der spezifischen B-Zellen (B-Zell-Elispot) wurden am Tag 0 und Tag 7 und 14 durchgeführt, die Untersuchung der spezifischen T-Zellen (T-Zell-Elispot) und der Proliferationsassay am Tag 0, 7 und 28.

Das Blut für Tag 0 wurde vor dem Verabreichen der Bakterienstämme abgenommen und gilt für alle drei genannten Untersuchungen als Nullwert der Studie.

B-Zell-Elispot, T-Zell-Elispot und Proliferationsassay fanden im Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie Tübingen, Prof. Dr. Meyer statt. Der Transport des heparinisierten Blutes von Freiburg nach Tübingen dauerte im Durchschnitt zwei Stunden. Während dieser Zeit wurde das Blut auf Umgebungstemperatur gehalten.

Von jedem Probanden wurden nach Verabreichung der letzten Impfung drei Stuhlproben gesammelt und mikrobiologisch auf Ausscheidung von Kontroll- oder Impfstamm untersucht. Die mikrobiologischen Untersuchungen des Stuhls wurden vom Labor der Universitätsklinik Freiburg durchgeführt.

Vorversuche und Etablierung der Methoden fanden am Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie in Berlin, Abteilung molekulare Biologie, Prof. Dr. Meyer statt.

2.1.5. Beobachtung der Verträglichkeit des Impfstoffes

Die Probanden wurden nach jeder der drei Impfungen für vier Stunden klinisch überwacht.

Für einen Zeitraum von zwei Tagen nach der Impfung wurden auftretende lokale oder systemische Nebenwirkungen in einen Überwachungsbogen eingetragen und den Studienärzten (Dr. med. Mansouri, Dr. med. Metzger) mitgeteilt. Aufgelistet im Fragebogen waren folgende klinische Auffälligkeiten: Bauchschmerzen, Appetitlosigkeit, Übelkeit, Erbrechen, Durchfall, Kopfschmerzen, Gliederschmerzen, allergische Reaktionen, Hautausschlag, Juckreiz und Atemnot.

Die Körpertemperatur wurde jeweils für zwei Tage nach Verabreichung axillar gemessen, Auffälligkeiten (Temp>38°C) wurden dokumentiert und den Studienärzten mitgeteilt.

Anamnese und körperliche Untersuchung sowie die Bestimmung hämatologischer (Blutbild) und klinisch-chemischer (Kreatinin, S-GOT, S-GTP) Blutparameter wurden an Tag 0, 7, 14, 28 durchgeführt (vgl. Auflistung S. 31).

Zusätzlich wurden mikrobiologische Untersuchungen des Stuhls von drei Stühlen im Anschluß an die letzte Impfung und beim Auftreten von Diarrhöen durchgeführt.

Schematische Darstellung des zeitlichen Ablaufs der Studie siehe Anhang Abb. 2

2.2. Anzucht des Impfstammes *Salmonella typhi* Ty21a(pDB1) und des Kontrollstammes *Salmonella typhi* Ty21a

Die Anzucht und Lagerung des Impfstammes *S. typhi* Ty21a(pDB1) und des Kontrollstammes *S. typhi* Ty21a fand im Max-Planck-Institut Berlin, Marienfelde statt. Nach der Inokulation der Bakterien auf jeweils 400ml Soja (Merck)-LB Medien wurden die Bakterien bis zu einer optische Dichte (OD) von 0,5 – 0,6 (Wellenlänge 600nm) bei 37°C und einer Frequenz 200 rounds per minute (rpm) im Schüttler herangezogen. Danach wurden die Bakterien geerntet, erneut in Soja-LB bis zu einer OD von 0,5 resuspendiert, mit 85% Glycerol gemischt und tiefgefroren (minus 80°C) in 1ml Aliquots gelagert.

2.2.1. Vorversuche zur Bestimmung der Wachstumskurve

Um die Zeit zum Erreichen der angestrebten Impfdosis von 1×10^{10} „colony forming units“ (cfu) pro ProbandIn zu ermitteln, wurden unter standardisierten Bedingungen an mehreren Tagen Wachstumskurven erstellt. Hierzu wurden jeweils 800µl des Impfstammes *S. typhi* Ty21a(pDB1) und des Kontrollstammes *S. typhi* Ty21a auf 400ml Soja (Merck)-LB Medien mit 0.001 % Galactose verimpft und bei 200rpm und 37°C im Schüttler bebrütet. In regelmäßigen Abständen (eine Stunde) wurde die OD gemessen und die Bakteriendichte bestimmt. Die Bakteriendichte wurde ermittelt, indem zu jedem Zeitpunkt der OD-Messung eine Verdünnungsreihe (Verdünnung: 1:10 bis 1: 1000000; Verdünnungsfaktor 10) angelegt wurde und von dieser Verdünnungsreihe ausgehend

–über Ausstreichen der Suspension auf LB-Platten (LB Agar, Cat.-No.: 22700-025; Life Technologies) und Bebrütung im Brutschrank bei 37°C und einer Luftfeuchtigkeit von 5% für 24 Stunden - die cfu bestimmt wurden. Durch diesen Versuchsaufbau gelang es erstens die OD zu bestimmen, bei der die gewünschte Bakteriendichte zur Verabreichung an die Probanden vorhanden ist, und zweitens die Zeit zu ermitteln, die Impf- und Kontrollstamm benötigen um eben diese optische Dichte zu erreichen.

2.2.2. Anzucht und Vorbereitung am Impftag

Am Abend vor jedem Impftag wurden dann 800µl des tiefgefrorenen Impfstamms und des Kontrollstamms aufgetaut und in 400ml Soja-LB plus 0,001% Galaktose verimpft. Bei einer Temperatur von 37°C und einer Frequenz von 200rpm wurden die Bakterien nun im Schüttler bis zu einer OD von 1 (Wellenlänge 600nm) herangezogen, danach geerntet, in PBS gewaschen und in PBS bis zu einer angestrebten Dichte von 2×10^9 cfu/ml resuspendiert. Vor Verabreichung des Impf- bzw. des Kontrollstamms wurden 5ml dieser Suspensionen mit 25ml 1,3 % Bicarbonatlösung vermischt.

2.3. Gewinnung der mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut (PBMZ)

Venöses Blut wurde morgens aus der Vena mediana cubiti entnommen und in standardisierten heparinisierten SARSTEDT-Monovetten gesammelt. Das entnommene Blut wurde in einem Verhältnis von 1:1 mit RPMI (RPMI 1640 Medium/ with L-Glutamine, Cat.-No.: 21875-034, Gibco-BRL, Life-Technologies) verdünnt.

In mit 15ml "FICOLL-Separation-Solution" gefüllte 50 ml Röhrchen wurde dann langsam 30ml verdünntes Blut aufgeschichtet so daß ein Volumenverhältnis von 1:2 FICOLL zu heparinisiertem Blut entstand. Bei einer Zentrifugation von 600g, 20 Minuten bei 20°C wurden die PBMZ von Serum und Erythrozyten getrennt und danach mit einer Pipette entnommen. Die entnommenen Zellen wurden in 45ml RPMI resuspendiert und bei einer Zentrifugation von 300g, 12 Minuten bei 10°C erneut getrennt. Die Überstände wurden verworfen und die PBMZ in einem Röhrchen gepoolt und dann in 10 ml RPMI

erneut resuspendiert und bei einer Zentrifugation von 300g, 12 Minuten 4°C getrennt. Dies entspricht dem Vorgang des Waschens der mononukleären Zellen.

Nach Abschütten des Überstandes wurden die PBMZ dann in einem definierten Volumen aufgenommen und nach einer 1:20 Verdünnung in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Zum Auftragen auf die 96-well-Platten wurden PBMZ für den B-Zell-Elispot und für den T-Zell-Elispot in RPMI resuspendiert. Für die Proliferationsmessung wurden die PBMZ in RPMI plus 10% AB-Serum (Human Serum AB, Cat.-No.: C15-021, PAA Laboratories GmbH), 1% Hybrimax, 1% Gentamycin, 1% Streptomycin und Interleukin 2 in einer Konzentration von 30 U/ml resuspendiert.

2.4. Proliferationsassay

Im Proliferationsassay wird der Grad der Aktivierung immunkompetenter Zellen über das Ausmaß der Proliferation bestimmt. Die proliferative Tätigkeit dieser Zellen wird durch Zugabe von radioaktiv markiertem Thymidin ermittelt. Der Thymidineinbau liefert ein quantitatives Maß für die DNA-Syntheserate, die der Zellteilungsrate direkt proportional ist.

In diesem Essay wurde sowohl die Immunantwort auf den Vektor (H-Antigen von *S. typhi*) als auch die Immunantwort auf rekombinante und native Urease untersucht.

Rekombinante und native Urease wurden benutzt, um einen möglichen Unterschied zwischen nativer und rekombinanter Urease in Bezug auf die Immunantwort zu eruieren.

Auf eine 96 well NUNC Platte (NUNC™: Nunc-Immuno™ Plate MaxiSorp™ Surface) wird zuerst eine Zellzahl von 250 000 PBMZ pro well in 100µl Medium aufgetragen. Das Medium besteht aus RPMI plus 10% AB-Serum, 1% Gentamycin, 1% Streptomycin, 1% Hybrimax sowie Interleukin 2 in einer Konzentration von 30 U/ml.

Die Zellen wurden dann durch Zugabe einer definierten Menge Antigen stimuliert. Als Stimulantien wurden hier verwendet:

1. Salmonellen-H-Antigen: 10^4 , 10^5 und 10^6 Bakterien pro ml
2. native Urease: 0,2/5/10 µg/ml
3. rekombinante Urease: 0,2/5/10 µg/ml
4. Tetanustoxin: 1/5/10 Lytic Factors
5. *Escherichia coli* LPS: 60 pg/ml, 15 ng/ml und 250 ng/ml
6. Protein GroEl: 0,5 µg/ml und 50 mg/ml
7. PHA: 1,5 und 10 µg/ml
8. Negativkontrolle: unstimulierte Zellen

LPS von *Escherichia coli* war in geringer Konzentration (120 ng/ml) in der Lösung der rekombinanten Urease enthalten, das Protein GroEl in geringer Konzentration in der Lösung der nativen Urease. Beide Antigene wurden in gereinigter Form als Negativkontrolle verwendet, um eine spezifische Reaktion auf Urease zweifelsfrei nachzuweisen.

Die Reaktion gegen Tetanustoxin wurde als zusätzlich Positivkontrolle und als Vergleichswert für eine Immunantwort gegen ein Fremdprotein untersucht.

Die Antigene wurden in 100 µl Medium doppelt konzentriert auf die Zellen gegeben, so daß am Ende pro well ein Volumen von 200 µl und eine Konzentration der Stimulantien, wie oben beschrieben, entstand.

Pro unterschiedlicher Konzentration der Stimulantien wurden drei wells belegt.

Als nächster Schritt wurden die Platten für bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Drei bzw. fünf Tage nach Auftragen der Zellen wurde 50µl pro well Überstand abgenommen und bei minus 70°C tiefgefroren. In den Überständen wurde später mittels der Elisa-Methode die Konzentration an Interferon gamma (IFN-γ) ermittelt. Nach Abnahme der Überstände an Tag 5, wurde 25µl pro well einer Verdünnung des radioaktiv markierten Thymidins (³H] Thymidin, Amersham, U.K.) zugegeben. Die Verdünnung bestand aus 24,5ml Medium (s.o) plus 0.5ml radioaktiv markiertem Thymidin (entspricht 1µCi).

Die Platten wurden dann für weitere zwei Tage im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert und danach bei minus 20°C tiefgefroren.

Das während der Proliferation der Zellen inkubierte radioaktiv markierte [³H]Thymidin wurde mit counts per minute (cpm) durch einen Microbeta counter (Microplate scintillation counter, Packard topcount) gemessen. Es wurde darauf geachtet, immer sämtliche Proliferationsassays einer Person (d.h. Proliferationsassay von Tag der

Studie: 0, 7, 28) gleichzeitig auszuwerten, um unspezifische Effekte auf die Auswertung möglichst gering zu halten.

2.5. B-Zell-Elispot

Der B-Zell-Elispot untersucht das Auftreten spezifischer Antikörper sezernierender Zellen (B-Zellen) im peripheren Blut. Die B-Zellen wurden über die Sekretion der Antikörper detektiert. Dabei wurden sowohl nach B-Zellen gesucht, die spezifisch für den Vektor waren (LPS und O-Antigen von *S. typhi*) als auch nach B-Zellen, die spezifisch für rekombinante und native Urease waren. Rekombinante und native Urease wurde benutzt um einen möglichen Unterschied zwischen nativer und rekombinanter Urease in Bezug auf die Immunantwort zu eruieren.

Zuerst wurden die speziell für den Test benutzten Cellulose-ester-membrane-bottomed Platten (MultiScreen®, 96-Well-filtration-Plate) mit unterschiedlichen Antigenen, beschichtet. Dies entspricht dem sog. "coating". Die Antigene wurden in einem Carbonatpuffer (NaHCO_3 2,93g; Na_2CO_3 1,5g ad 1l Aqua dest.; entspricht: 0,05M Carbonate pH 9,6) gelöst. Dieser Puffer wird im folgenden "Elispot coating buffer" genannt. Die Antigene wurden in folgender Konzentration aufgetragen:

1. Salmonellen LPS: 5 µg/ml
2. Salmonellen O-Antigen (intakte Bakterien: 10^8 Zellen pro ml in PBS)
3. Rekombinante Urease: 20 µg/ml
4. Native Urease (aufgereinigt aus *H. pylori* Lysat; Stamm: p76/ 20 µg/ml)
5. Anti-human-IgG als positiv Kontrolle: 4µg/ml (Sigma, Anti-human-polyvalent-immunoglobulins, developed in rabbit, Product No.: I-8010)
6. Neg. Kontrolle: no coating

Die Antigene wurden über Nacht bei einer Temperatur von 4°C im Kühlschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Platten mit einem Standardprogramm im Elisa-Waschgerät (TECAN) gewaschen. Ein Waschzyklus entspricht 9 Waschschritten mit je

300 µl Volumen pro well und einer Einwirkzeit von drei Sekunden. Zum Waschen wurde PBS verwendet. Jede Platte wurde mit 2 Zyklen gewaschen, zwischen den Waschschritten wurden die Platten auf saugfähiges Papier gestellt und danach eine Stunde lang bei Raumtemperatur in 300 µl PBS pro well stehen gelassen.

Nach Entfernen des PBS, wurde dann zum "Blocken" der freien Bindungsplätze Bovine Serum Albumin (BSA) in einer Konzentration von 3% in PBS mit 200 µl pro well auf die Platte aufgetragen und bei Raumtemperatur für eine Stunde inkubiert. Danach wurden die Platten, wie oben beschrieben, mit zwei weiteren Waschzyklen gewaschen und dann die PBMZ aufgetragen.

Die PBMZ wurden in einer Konzentration von 500 000, 250 000, 100 000 und 10 000 (Positivkontrolle) Zellen pro well auf die Platten gegeben und für vier Stunden bei einer Temperatur von 37°C inkubiert.

Nach vier Stunden wurden die Zellen verworfen und die Platten mit PBS, 0.05 % Tween 20 gewaschen. Es folgten zwei weitere Waschzyklen.

In einer Verdünnung von 1:100 000 wurde dann der Detektions-Antikörper (DIANOVA, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.; Biotin-SP-konjugated AffiniPure Rabbit anti-Human IgG,M,A) mit Spezifität gegen die drei Immunglobulin Isotypen Ig G, Ig A und Ig M in Konjugatpuffer aufgetragen.

Die Platten wurde eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem Detektions-Antikörper inkubiert und nach erneutem zweimaligem Waschen mit PBS, 0.05 % Tween wurde die Streptavidin konjugierte alkalische Phosphatase zugegeben (DIANOVA, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.; Phosphatase - conjugated Streptavidin, Code Number: 016-030-084). Die alkalische Phosphatase wurde 1:10 000 verdünnt und ebenfalls eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Abschließend, nach einem weiteren Waschschrift, wurde als Substrat für die alkalische Phosphatase BCIP/NBT buffered Substrat Tabletten (Sigma, Product No. B5655) in 10 ml destilliertem Wasser hinzugegeben. Die Platte wurde dann bei 37°C im Brutschrank erneut inkubiert und danach mit destilliertem Wasser gereinigt.

Die Platten wurden mit Hilfe eines einen Elispot-Reader (Bioreader®, Bio-Sys GmbH) ausgewertet. Ein „Spot“ entspricht dabei einem B-Lymphozyten, der spezifische Antikörper gegen das jeweilige Antigen sezerniert.

2.6. T-Zell-Elispot

Der T-Zell-Elispot dient zur Untersuchung spezifischer T-Zellen. Die T-Zellen werden mit einem bestimmten Antigen inkubiert. Eine Reaktion der T-Zellen wird über Sekretion von IFN- γ detektiert.

Es wurde sowohl nach T-Zellen spezifisch für den Vektor (H-Antigen von *S. typhi*) als auch nach T-Zellen spezifisch für rekombinante und native Urease gesucht. Rekombinante und native Urease wurde benutzt, um einen möglichen Unterschied zwischen nativer und rekombinanter Urease in Bezug auf die Immunantwort zu eruieren.

Als erster Schritt wurden die Cellulose-ester-membrane-bottomed Platte (MultiScreen®, 96-Well-filtration-Plate) mit anti-human IFN- γ (R&D Systems, purified mouse monoklonal IgG_(2a); Nr.: MAB 285) in einer Konzentration von 5 μ g/ml, 100 μ l pro well in "Elispot coating buffer"(s.o.) beschichtet und über Nacht im Kühlschrank bei 4°C inkubiert.

Am nächsten Morgen wurden die Platten mit dem oben beschriebenen Verfahren gewaschen und für eine Stunde bei Raumtemperatur in PBS inkubiert. Nach erneutem Waschen (s.o.) wurde für zwei Stunden bei 37°C im Inkubator die Platte geblockt. Der Blocking-Puffer hat eine Konzentration von 1% BSA/PBS. Anschließend wurden nach erneutem Waschen (s.o) die zuvor durch Ficoll aufgereinigten Zellen aufgetragen. Es wurden Konzentrationen von 500 000, 250 000, 100 000, 50 000 und 10 000 Zellen pro well benutzt.

Die Zellen wurden in 100 μ l RPMI pro well aufgenommen.

Als nächstes wurden die Zellen in den wells mit verschiedenen Antigenen verschiedener Konzentration stimuliert:

- Stimulantien:
1. Salmonellen-H-Antigen: 10⁶ /ml
 2. Native Urease: 10 μ g/ml
 3. Rekombinante Urease: 10 μ g/ml
 4. TT: 5 LF
 5. LPS von *Escherichia coli*: 15ng/ml
 6. GroEl: 0,5 μ g/ml
 7. Pos. Kontrolle: ConA: 1 μ g/ml, PMA/Iono: 100ng/0,5ng
 8. Neg. Kontrolle: unstimulierte Zellen

Die Antigene wurden für 24 Stunden bei einer Temperatur von 37°C im Brutschrank inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Zellen verworfen und die Platten wurden wie oben beschrieben zweimal, diesmal mit Tween-Zusatz, gewaschen. Danach wurde der zweite Antikörper oder „detection“-Antikörper (Biotinylated purified goat IgG, Nr.: BAF285) in einer Konzentration von 0.1 µg/ml, 100 µl pro well zugegeben. Die Platte und der detection-Antikörper wurde für zwei Stunden bei einer Temperatur von 37°C im Brutschrank inkubiert, danach erneut mit Tween-Zusatz gewaschen und die alkalische Phosphatase (DIANOVA, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.; Phosphatase-conjugated Streptavidin, Code Number: 016-030-084) mit einer Verdünnung 1:10 000 zugegeben. Die Inkubationszeit betrug hier eine Stunde und wurde bei einer Temperatur von 37°C im Brutschrank durchgeführt.

Abschließend, nachdem die Platten erneut mit PBS, 0.05% Tween 20 gewaschen waren, wurde als Substrat BCIP/NBT buffered Substrat Tabletten (Sigma, Product No. B5655) in 10 ml destilliertem Wasser verwendet. Die Platte wurde dann bei 37°C im Brutschrank erneut inkubiert und danach mit destilliertem Wasser gereinigt.

Die Platten wurden durch einen Elispot-Reader (Bioreader®, Bio-Sys GmbH) ausgewertet. Ein „Spot“ entspricht dabei einem T-Lymphozyten, der durch das spezifische Antigen aktiviert wurde.

2.7. Enzyme-linked immunosorbent assay (Elisa)

Elisa-Tests wurden zur Bestimmung der Antikörper gegen native und rekombinante Urease und gegen Salmonellen-O-Antigen und Salmonellen LPS durchgeführt. Zusätzlich wurde dieser Test dazu verwendet Interferon-Gamma (IFN-γ) in den Überständen des Proliferationsassay zu quantifizieren.

Es wurde bei der Auswertung darauf geachtet, möglichst alle Personen zu allen Tagen der Studie (Tag 0, 7, 14, 28) gleichzeitig zu testen, um die Möglichkeit der Beeinträchtigung der Ergebnisse durch unspezifischer Effekte (z.B. unterschiedliche Medien, unterschiedliche Temperatur) zu minimieren.

Im folgenden soll zuerst der Elisa zur Bestimmung der Antikörper im Serum der Probanden gegen native und rekombinante Urease und gegen Salmonellen-O-Antigen

und Salmonellen LPS besprochen werden. Bestimmt wurden hierbei der Antikörpertyp IgG.

2.7.1. Messung der spezifischen Antikörper im Serum

Verwendet wurden 96-well Platten der Firma NUNC™: Nunc-Immuno™ Plate MaxiSorp™ Surface.

Die 96-well Platten wurden mit 100 µl/well gecoated und über Nacht bei 4°C im Kühlschrank belassen. Als Coating-Antigen wurden 5 µg/ml native, bzw. rekombinante Urease oder 10⁸ Bakterien/ml Salmonellen-O-Antigen, bzw. 5 µg/ml Salmonellen-LPS benutzt. Die Negativkontrolle enthielt 1 % BSA/PBS als Coating-Antigen. Die Antigene wurden in „Elispot coating-buffer“ (s.o) gelöst.

Am nächsten Morgen wurde die Platten mittels Elisa-Washer (s.o.) mit dem Programm Nr. 3 gewaschen. Dieses Programm verwendet pro Waschschrift 400 µl PBS/0.05 % Tween Waschlösung pro well bei einer Einwirkzeit von einer Sekunde. Jede Platte wurde hierbei drei Mal gewaschen.

Danach wurden die Platten mit 1 % BSA/PBS für zwei Stunden bei Raumtemperatur auf einem Schüttler geblockt.

Nach einem weiteren Waschschrift mit Programm Nr. 3 wurde danach 50 µl/well des Serum in einer Verdünnung von 1:200 für Salmonellen-O-Antigen und Salmonellen LPS, 1:200 und 1:800 für native und rekombinante Urease aufgetragen und für weitere zwei Stunden auf dem Schüttler bei Raumtemperatur belassen. Die Plattenbelegung war dabei so, daß pro Proband (1-12) und Tag der Studie (0, 7, 14, 21, 28) vier wells einer Verdünnung bei Salmonellen-O-Antigen und Salmonellen LPS, bzw. zwei wells einer Verdünnung bei native und rekombinante Urease zur Verfügung standen. Als Positivkontrolle wurden jeweils bereits getestete Seren mit hohen Antikörper-Titern benutzt. Bei der Negativkontrolle wurde als Coating-Lösung anstatt des Antigens 1 % BSA/PBS verwendet.

Die Platten wurden dann erneut mit Programm Nr. 3 gewaschen.

Als nächster Schritt wurde 50 µl/well des „Detection“-Antikörper (Peroxidase-conjugated AffiniPure Rabbit Anti-Human IgG (H+L), Code Number: 309-035-082, Jackson

ImmunoResearch Laboratories, Inc.) auf die Platten gegeben und diese erneut bei Raumtemperatur auf einem Schüttler für eine Stunde belassen.

Die Platten wurden dann wieder mit Programm Nr. 3 gewaschen und danach 100 µl/well Substratlösung (50 µl TMB Peroxidase Substrate, Product Code 50-76-01; 50 µl/well Peroxidase Solution B (H₂O₂), Product Number: 50-65-00; Kirkegaard Pery Laboratories) hinzu pipettiert. Die Substratlösung wurde 30 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Schüttler belassen und dann mit 50 µl/well Schwefelsäure (1M) gestoppt. Die Daten wurden mittels Elisa-Reader (SpectraMax 250, Molecular Devices) gemessen und mit der Software SoftMax Pro ausgewertet.

2.7.2. Messung der Zytokine in den Überständen

Wie bereits oben beschrieben, wurden an Tag drei und fünf nach Auftragen der Zellen jeweils 50 µl Überstände von den Platten des Proliferationsassay abgenommen und bei -20°C tiefgefroren.

Die Messung des durch spezifische Stimulation (s.o.) von den PBMZ sezernierten IFN-γ wurde mittels Elisa vorgenommen. Benutzt wurde hierbei ein Standard Elisa Kit (Human-IFN-γ-CytoSets™, BioSource).

Für den Elisa wurden 96-well Platten der Firma NUNC™: Nunc-Immuno™ Plate MaxiSorp™ Surface verwendet.

Im ersten Schritt wurden diese Platten mit dem sog. „capture“-Antikörper (Human-IFN-γ-CytoSets™, Coating Antibody, Product-No.: 58.123.08) gecoaed. Nach der Verdünnung auf 2 µg/ml mit „Standard Diluent“ (PBS plus 0,5% BSA u. 0,1% Tween) wurde der capture antibody in einem Volumen von 50 µl pro well hinzugegeben.

Die Platten wurden dann über Nacht bei 4°C im Kühlschrank belassen.

Am nächsten Tag wurden die Platten mit einem Elisa-Washer gewaschen und danach für zwei Stunden bei Raumtemperatur geblockt. Blocking Puffer und Waschprogramm entsprechen denen des Urease- bzw. Salmonellen-Antigen-Elisa.

Nach erneutem Waschen wurde ein Volumen von 25 µl RPMI pro well aufgetragen und mit 25 µl der aufgetauten Überstände pro well vermischt, so daß eine Verdünnung der Überstände mit dem Verdünnungsfaktor zwei entstand und ein Volumen von 50 µl pro well resultierte.

Die Belegung der Elisa-Platten entsprach dabei der Belegung der Proliferationsassays. Die verdünnten Überstände wurden bei Raumtemperatur für zwei Stunden auf den Platten belassen.

Nach einem erneuten Waschschrift wurde der zweite oder „detection“-Antikörper (Human-IFN- γ -CytoSets™, Detection Antibody, Product-No.: 58.123.02) in einer Verdünnung von 1:2000 und einer Konzentration von 0,4 μ l mit einem Volumen von 50 μ l pro well aufgetragen. Die Platten wurden dann für eine weitere Stunde bei Raumtemperatur auf dem Schüttler belassen und danach die Substratlösung (50 μ l/well TMB Peroxidase Substrate, Product Code 50-76-01; 50 μ l/well Peroxidase Solution B (H₂O₂), Product Number: 50-65-00; Kirkegaard Pery Laboratories) in einem Volumen von 100 μ l pro well hinzu pipettiert.

Nach 30 Minuten bei Raumtemperatur wurde die Stop-Lösung (1M Schwefelsäure) hinzugegeben und die Platten dann bei einer Wellenlänge von 450 nm mittels ELISA-Reader (SpectraMax 250, Molecular Devices) gemessen und mit der Software SoftMax Pro ausgewertet.

Auf jeder Elisa-Platte wurden 8 Doppelwells verwendet, um eine Standardkurve für IFN- γ zu ermitteln. Dazu wurde der von Biosource gelieferte Standard mit einer Konzentration von 2 ng/ml IFN- γ jeweils um den Faktor zwei verdünnt, daß am Ende eine Konzentration von 0,05625 ng/ml IFN- γ resultierte.

Nach Vergleich mit den Standardkurven wurden für IFN- γ Konzentrationen von mehr als 100 pg/ml als eine positive Antwort gewertet.

Signifikante Unterschiede in der Höhe der IFN- γ Produktion vor und nach Impfung wurden mittels Wilcoxon Rangsummentest ermittelt.

III Ergebnisse

1. Wachstumskurve und Anzahl der verabreichten Bakterien

Im Vorfeld der Untersuchung wurde eine Wachstumskurve erstellt, um die OD zu bestimmen, bei der die gewünschte Bakteriendichte zur Verabreichung an die Probanden vorhanden ist, und die Zeit zu ermitteln, die Impf- und Kontrollstamm benötigen um eben diese OD zu erreichen.

Als Impfdosis wurde eine Anzahl zwischen 1×10^9 und 1×10^{10} cfu pro Proband sowohl für den Impfstamm *S. typhi* Ty21a(pDB1) als auch für den Kontrollstamm *S. typhi* Ty21a angestrebt.

Nach der Auswertung der Wachstumskurven stellte sich heraus, daß bei einer OD (600nm) von 0.96 ca. $3,2 \times 10^8$ cfu/ml des Impfstammes *S. typhi* Ty21a(pDB1) und bei einer OD von 0.97 ca. $7,6 \times 10^9$ cfu/ml des Kontrollstammes *S. typhi* Ty21a vorhanden sind.

Berechnet man den Verlust an lebensfähigen Organismen von ca. 40% durch die Zentrifugation (4500rpm, 5min bei 20°C) und die Konzentrierung durch Aufnahme in ein kleineres Volumen, so muß ein Volumen von 1,2ml je Proband der Suspension mit *S. typhi* Ty21a und ein Volumen von 4ml je Proband der Suspension mit *S. typhi* Ty21a(pDB1) verabreicht werden. Dies entsprach $7,5 \times 10^9$ cfu des Kontrollstammes *S. typhi* Ty21a und $7,6 \times 10^9$ des Impfstammes *S. typhi* Ty21a.

Der Kontrollstamm *Salmonella typhi* Ty21a benötigte eine Zeit von ca. 14 Stunden bis zu einer OD von 0.97. Der Impfstamm *S. typhi* Ty21a(pDB1) benötigte eine Zeit von ca. 15.5 Stunden bis zu einer OD von 0.96.

Die tatsächliche Anzahl der verabreichten Bakterien wurde an jedem Impftag nach Anzucht im Schüttler mittels einer Titrierung bestimmt.

Die Titrierung hatte jeweils den Verdünnungsfaktor 10. Die Bakterien wurden auf LB-Platten (LB Agar, Cat.-No.: 22700-025; Life Technologies) ausgestrichen. Im Brutschrank bei 37°C und einer Luftfeuchtigkeit von 5% für 24 Stunden bebrütet und danach ausgezählt.

Nach der Auszählung der Platten stellte sich heraus, daß an Tag null 6×10^9 , an Tag zwei 7×10^9 , und an Tag vier 9×10^9 cfu verabreicht wurden.

Die Impfdosis lag also an allen drei Tagen im von uns angestrebten Intervall von 1×10^9

bis 1×10^{10} cfu.

Sowohl der Kontrollstamm *S. typhi* Ty 21a als auch der Impfstamm *S. typhi* Ty21a(pDB1) bildeten im Ausstrich lebensfähige Kolonien.

2. Nebenwirkungen

Keiner der Probanden klagte über schwere Nebenwirkungen. In keinem der Fälle konnte Fieber oder eine andere systemische Beeinträchtigung durch den Impfstamm beobachtet werden.

Sonstige Nebenwirkungen:

Proband-Nr.:	Tag der Studie	Art der Nebenwirkung:
4	7	abdominelle Tenesmen und Kopfschmerzen
9	0	abdominelle Tenesmen und leichte Diarrhö
10	4	Kopfschmerzen
12	0 und 2	Kopfschmerzen

Keines der angegebenen Symptome wurden subjektiv von den Probanden als schwerwiegend bezeichnet und keines der Symptome persistierten für länger als 24 Stunden.

Die Probanden-Nr. 9, 10 und 12 sind Frauen, Proband-Nr. 4 ist männlich.

Anamnese und körperliche Untersuchung sowie die Bestimmung hämatologischer (Blutbild) und klinisch-chemischer (Kreatinin, S-GOT, S-GTP) Blutparameter ergaben zu keinem Zeitpunkt pathologische Werte.

Aus den Stuhlproben konnte weder der Impfstamm *S. typhi* Ty21a(pDB1) noch der Kontrollstamm *S. typhi* Ty21a angezüchtet werden.

3. humorale Immunantwort

3.1. B-Zell- Elispot

Die Ergebnisse des B-Zell-Elispot werden getrennt nach der Antwort auf die spezifischen Antigene dargestellt. Zuerst wird die Immunantwort der B-Zellen auf den Trägerstamm, d.h. gegen Salmonellen-O-Antigen und Salmonellen-LPS, dann die Immunantwort gegen native und rekombinante Urease dargestellt.

3.1.1. Immunreaktion gegen Salmonellen-O-Antigen und Salmonellen-LPS im B-Zell-Elispot

Antikörper sezernierende Zellen (ASZ) gegen Salmonellen-O-Antigen und/oder Salmonellen-LPS wurden in 10 von 12 Probanden gefunden (=83%).

Bei 10 Probanden konnte eine Immunantwort gegen LPS nachgewiesen werden (Proband-Nr.: 1-4, 6-8, 10-12) und bei 9 Probanden gegen Salmonellen-O-Antigen (Proband-Nr.: 2-4, 6-8, 10-12). Proband-Nr. 1 reagierte im B-Zell-Elispot nur auf das LPS von *S. typhi* nicht jedoch gegen das O-Antigen.

Die mittlere Anzahl detektierter spots an Tag 0, dem Tag vor Verimpfung und damit dem Nullwert, betrug ein spot pro 1 Million PBMZ mit einem Intervall von 0-9 spots/Mio. PBMZ.

Die mittlere Anzahl detektierter spots an Tag 7 entsprach im arithmetischen Mittel 84 spots/Mio. PBMZ mit einem Intervall von 8-352 spots/Mio. PBMZ für Salmonellen LPS und 78 spots/Mio. PBMZ mit einem Intervall von 4-387 für das O-Antigen.

An Tag 14 der Studie waren keine ASZ im peripheren Blut mehr nachweisbar.

In den Negativkontrollen (no coating) waren im Mittel 2 spots/Mio. PBMZ auffindbar mit einem Intervall von 0-6 spots/Mio. PBMZ. In den Positivkontrollen im Mittel 657 spots/Mio. PBMZ mit einem Intervall von 38 – 5025 spots/Mio. PBMZ.

Mehr als 10 spots pro well wurden als positives Ergebnis angesehen. Dies entspricht dem arithmetischen Mittelwert der Negativkontrollen plus der dreifachen Standardabweichung.

Siehe Tabelle 1, Anhang

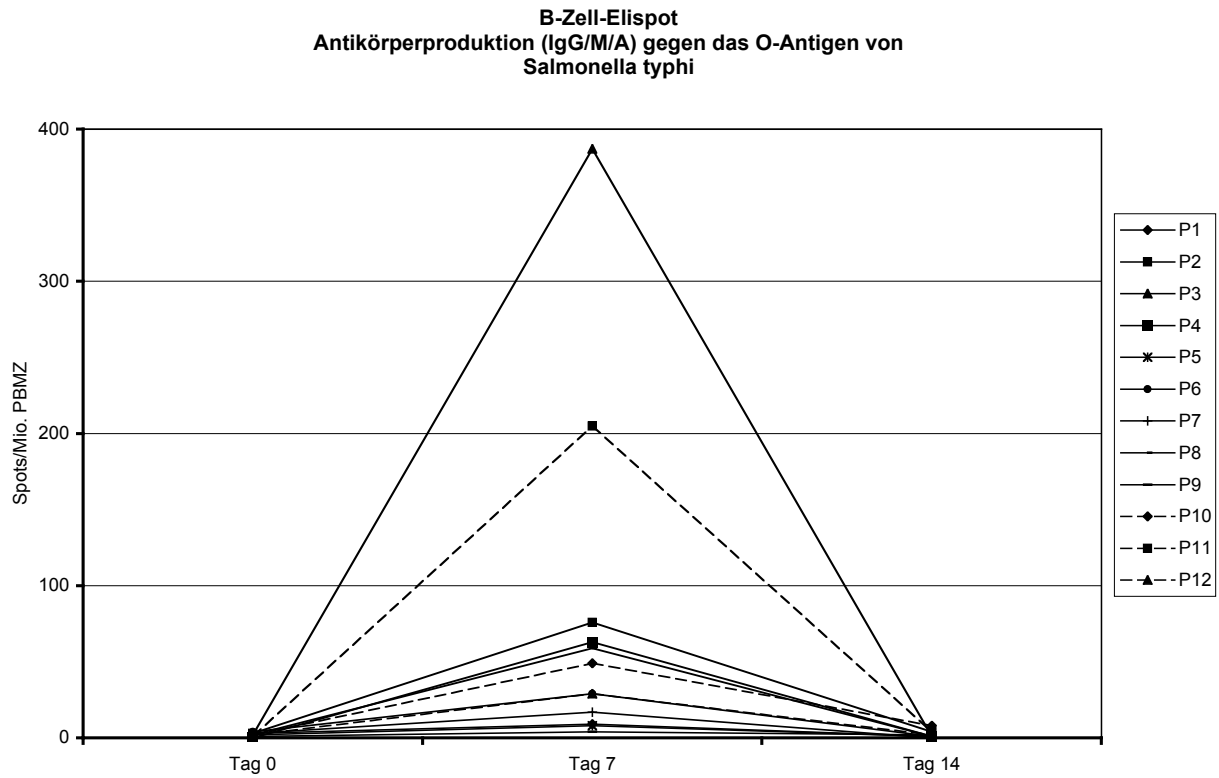


Abb. 2: B-Zell-Elispot: O-Antigen

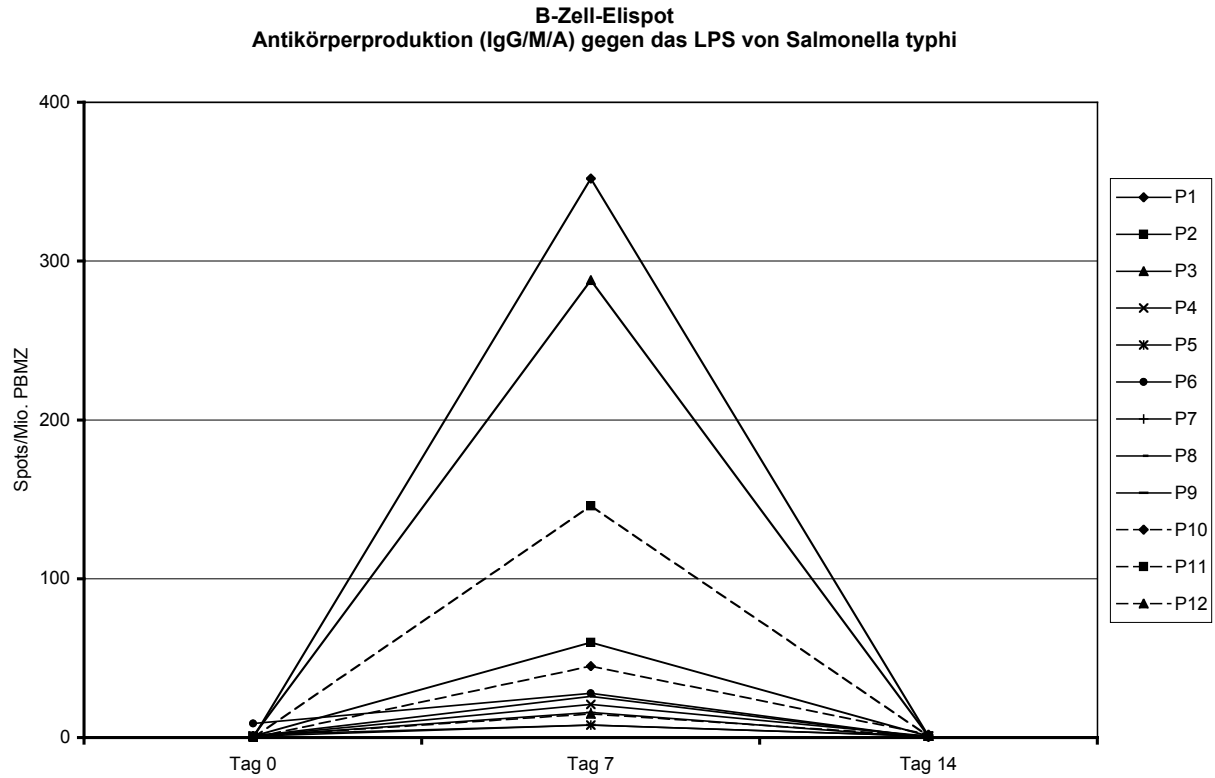


Abb. 3: B-Zell-Elispot: LPS

3.1.2. Immunreaktion gegen native und rekombinante Urease im B-Zell-Elispot

Plasmazellen, die spezifische Antikörper gegen native oder rekombinante Urease produzieren, konnten weder an Tag 7 noch an Tag 14 der Studie im B-Zell-Elispot nachgewiesen werden.

Siehe Tabelle 1, Anhang

3.2. Elisa

Zur Auswertung des Elisa wurden Tag 0 und Tag 28 der Studie verglichen.

Als signifikante Erhöhung der Antikörperproduktion (IgG) wurde eine Zunahme der OD bei einer Wellenlänge von 450nm um jeweils den Mittelwert plus drei Standardabweichungen der Negativkontrollen gewertet.

3.2.1. Antikörper im Serum gegen Salmonellen-O-Antigen und Salmonellen LPS

Eine signifikante Erhöhung der OD zwischen Tag 0 und Tag 28 der Studie als Zeichen einer Zunahme spezifischer Antikörper der Subklasse G konnte bei zwei Probanden nachgewiesen werden (Proband-Nr.: 3, 11; =16%).

Beide Probanden hatten einen signifikanten Anstieg der spezifischen Antikörper gegen Salmonellen-O-Antigen und Salmonellen-LPS.

Als Serokonversion wurde eine Erhöhung der OD um 0.2 für Salmonellen-O-Antigen und für Salmonellen-LPS gewertet. Eine OD-Erhöhung um 0,2 entspricht dem Mittelwert der Negativkontrollen plus drei Standardabweichungen.

Proband-Nr.5 hatte an Tag 0 der Studie sowohl für Salmonellen-O-Antigen als auch für Salmonellen-LPS eine OD, die oberhalb von 0.2 (O-Antigen: Proband-Nr.5, Tag 0: OD=0,310; LPS: Proband-Nr.5, Tag 0, OD=0,222) lag und im Verlauf der Studie keine signifikante Erhöhung der OD.

Siehe Tabelle 2, Anhang

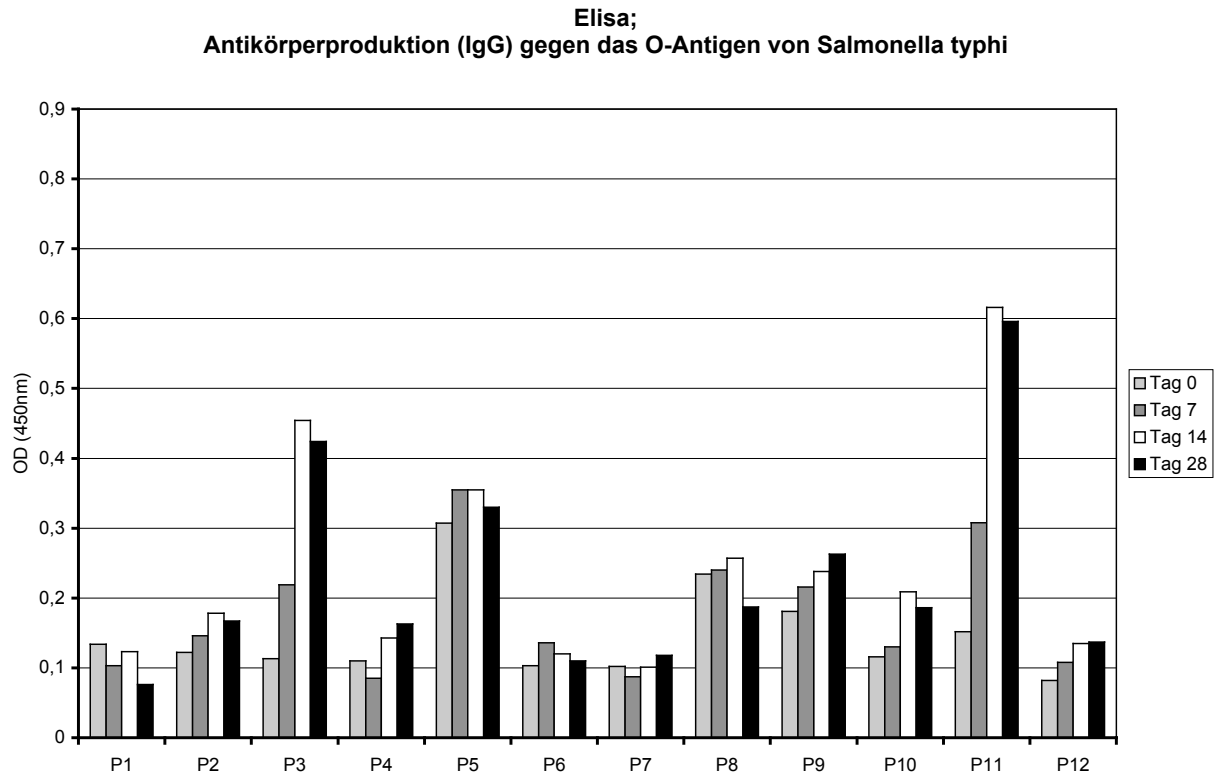


Abb. 4: Elisa: O-Antigen

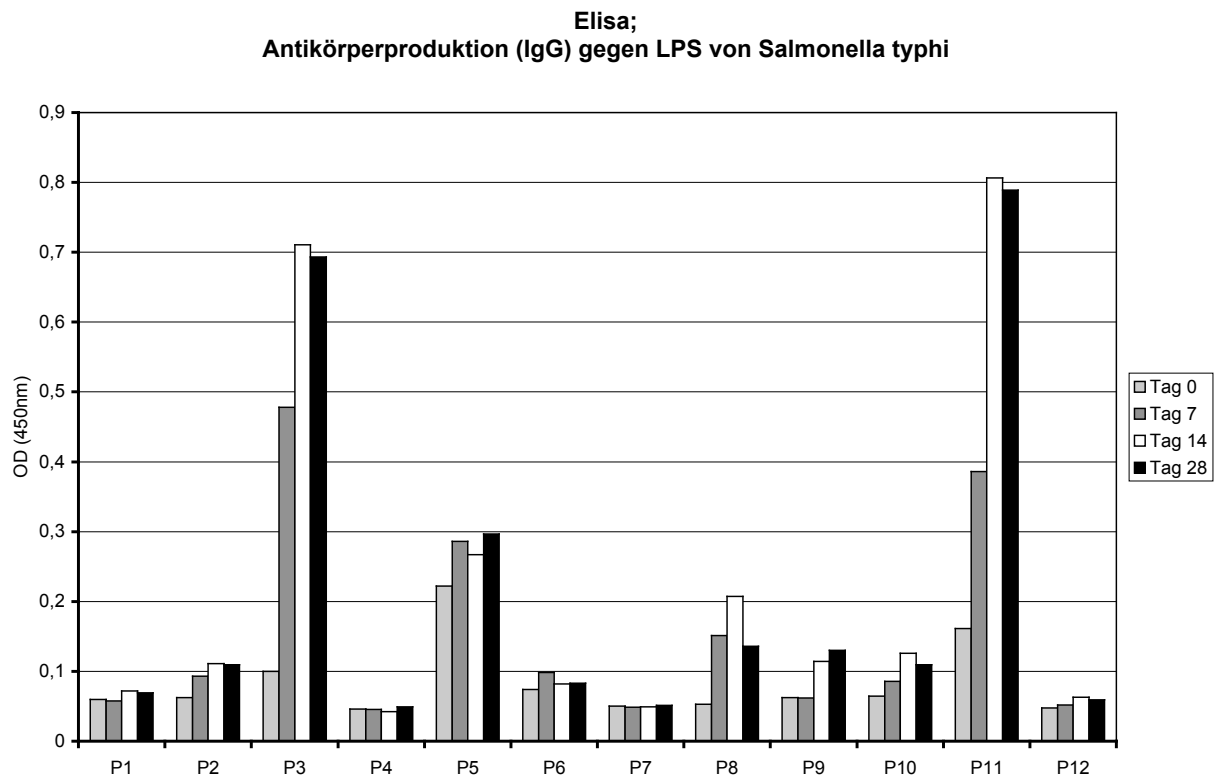


Abb. 5: Elisa: LPS

3.2.2. Antikörper im Serum gegen native und rekombinante Urease

Eine signifikante Erhöhung der OD zwischen Tag 0 und Tag 28 der Studie als Zeichen einer Zunahme spezifischer Antikörper der Subklasse G gegen native oder rekombinante Urease konnte bei keinem der zwölf Probanden nachgewiesen werden.

4. zelluläre Immunantwort

4.1. T-Zell-Elispot

Die Ergebnisse des T-Zell-Elispots werden ebenfalls getrennt nach Antigenen dargestellt. Zuerst soll die spezifische Immunantwort auf die Antigene des Trägerstamms, d.h. gegen Salmonellen-H- und Salmonellen-O-Antigen, dargestellt werden, danach die spezifische Immunantwort auf native und rekombinante Urease.

4.1.1. Immunreaktion gegen das Salmonellen-H-Antigen im T-Zell-Elispot

Signifikante IFN- γ Produktion als ein Marker einer spezifischen T-Zell-Stimulierung auf Salmonellen-H-Antigen konnte im T-Zell-Elispot bei zwei von 12 Probanden (Proband-Nr.: 2, 10; =16,7%) nachgewiesen werden.

Vor der Verabreichung des Impfstoffes, also an Tag 0 der Studie waren im Mittel 7 spots/Mio. PBMZ für das Salmonellen-H-Antigen (Intervall. 2-17 spots/Mio. PBMZ) nachweisbar. An Tag 28 der Studie konnten im Mittel 13 spots/Mio. PBMZ für das Salmonellen-H-Antigen (Intervall: 8-21spots/Mio. PBMZ) nachgewiesen werden.

In den Negativkontrollen - den unstimulierten wells - lag die durchschnittliche Zahl der spots bei 7 spots/Mio. PBMZ mit einem Intervall von 1-16 spots/Mio. PBMZ.

Als positive Reaktion auf Salmonellen-H-Antigen wurden mehr als 20 spots/Mio. PBMZ gewertet. 20 spots/Mio. PBMZ entsprechen dem arithmetischen Mittelwert der Negativkontrollen plus drei Standardabweichungen.

Siehe Tabelle 3, Anhang

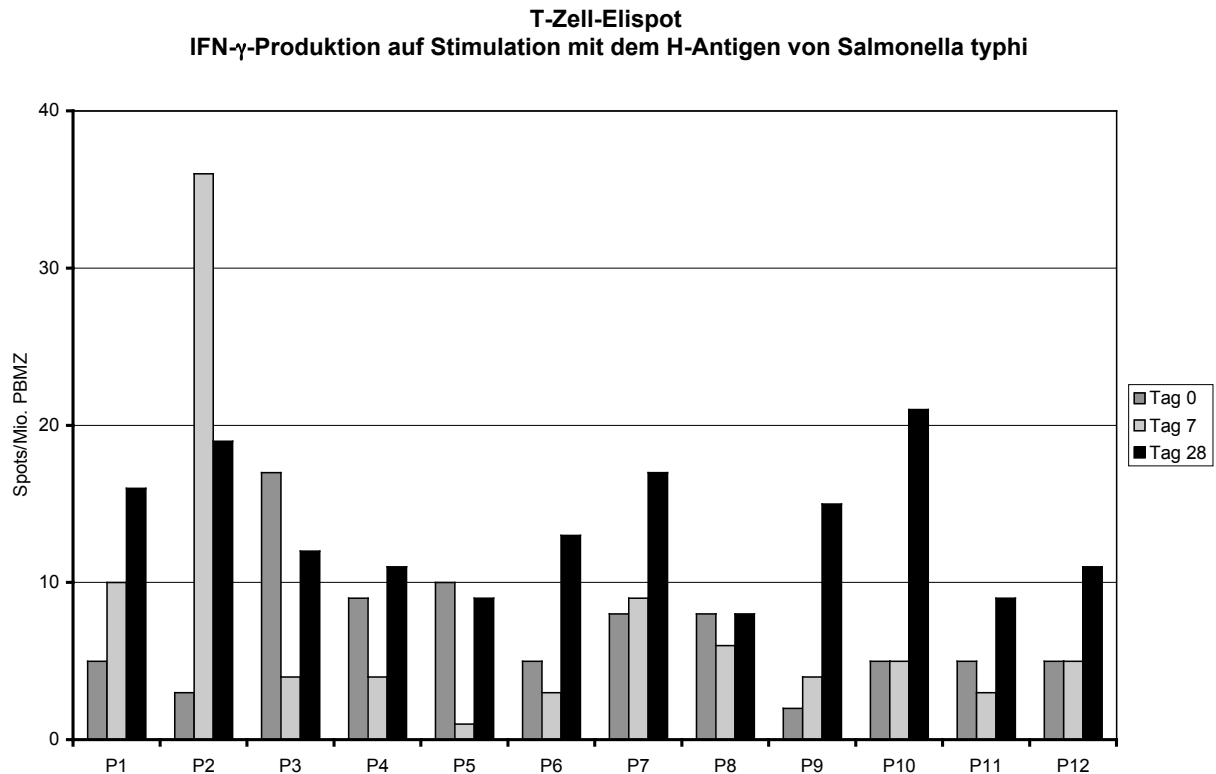


Abb. 6: T-Zell-Elispot: H-Antigen

4.1.2. Immunreaktion gegen native und rekombinante Urease im T-Zell-Elispot

Eine signifikante IFN- γ Produktion als ein Marker einer spezifischen T-Zell-Stimulierung auf rekombinante Urease konnte bei vier von zwölf Probanden nachgewiesen werden (Proband-Nr.: 2, 5, 10, 11; =33,3%). Auf native Urease reagierten im T-Zell-Elispot drei von zwölf Probanden (Proband-Nr.: 2, 4, 7; =25%).

An Tag 0 der Studie waren im Mittel 6 spots/Mio. PBMZ bei Stimulation mit rekombinanter Urease nachweisbar und 3 spots/Mio. PBMZ bei Stimulation mit nativer Urease.

An Tag 28 der Studie lag der arithmetische Mittelwert aller Probanden bei Stimulation mit rekombinanter Urease bei 17 spots/Mio. PBMZ und bei Stimulation mit nativer Urease bei 19 spots/Mio. PBMZ.

Proband-Nr. 10 verzeichnete bei Stimulation mit rekombinanter Urease die größte Zunahme an spots (Tag 0: 7 spots/Mio. PBMZ; Tag 28: 30 spots/Mio. PBMZ).

Proband-Nr. 2 hatte bei Stimulation mit nativer Urease die größte Zunahme (Tag 0: 2 spots/Mio. PBMZ; Tag 28: 45 spots/Mio. PBMZ).

Als positive Reaktion auf rekombinante bzw. native Urease wurden mehr als 20 spots/Mio. PBMZ gewertet. 20 spots/Mio. PBMZ entspricht dem arithmetischen Mittelwert der negativ Kontrollen plus drei Standardabweichungen.

Siehe Tabelle 3, Anhang

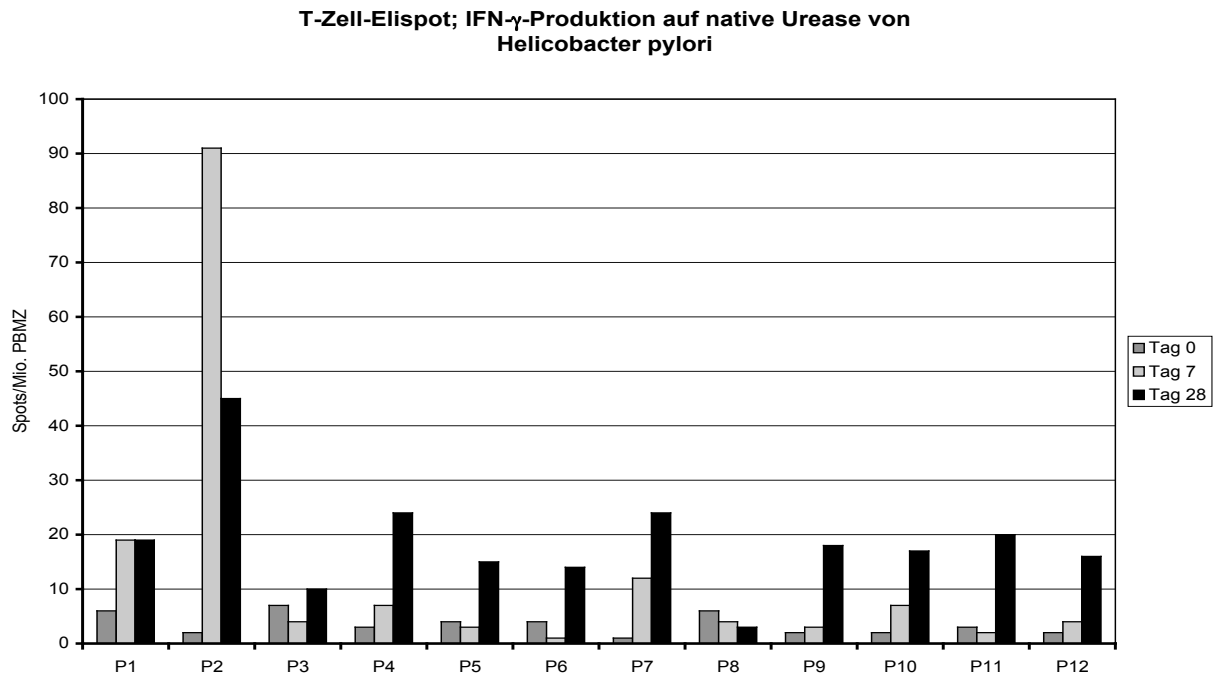


Abb. 7: T-Zell-Elispot: native Urease

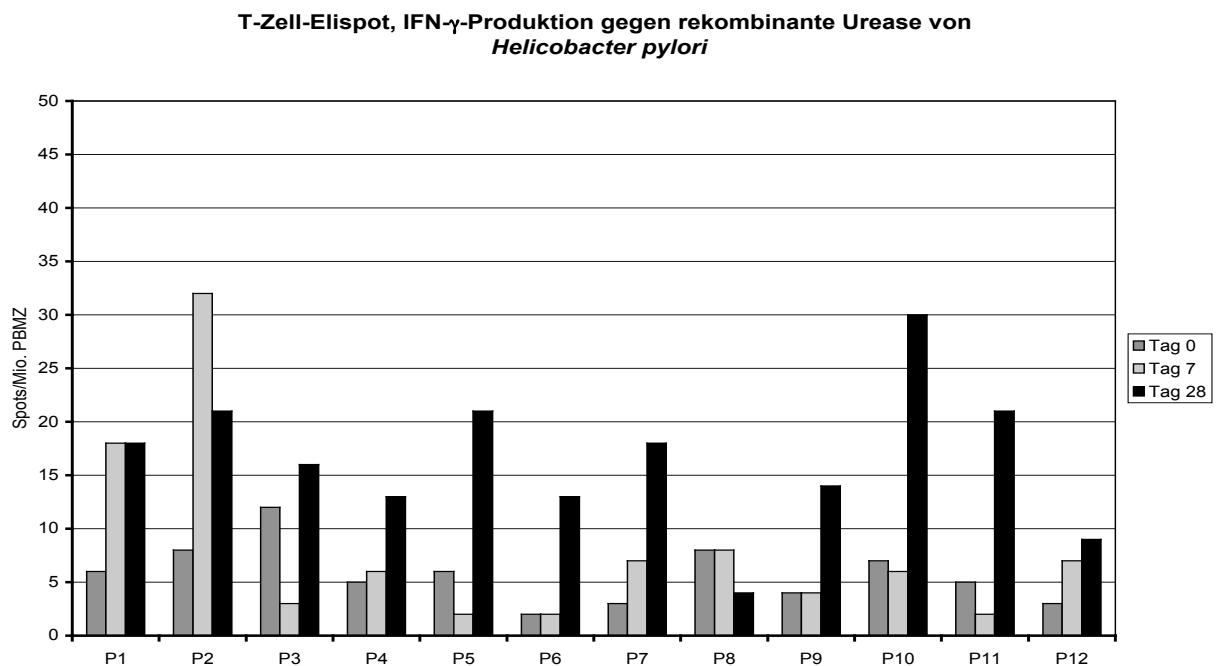


Abb. 8: T-Zell-Elispot: rekombinante Urease

4.2. Proliferationsassay

4.2.1. Immunreaktion gegen das Salmonellen-H-Antigen im Proliferationsassay

Eine signifikante Erhöhung der Radioaktivität (gemessen in cpm) als Marker einer spezifischen Reaktion auf das Salmonellen-H-Antigen konnte im Proliferationsassay bei drei von zwölf Probanden nachgewiesen werden (Proband-Nr.: 1, 3, 5; = 25%).

Vor Verabreichung des Impfstoffes, also an Tag 0 der Studie, betrug die Radioaktivität im arithmetischen Mittel 3928,71 cpm (mit einem Intervall von 596,30 – 12943,80 cpm) für das Salmonellen-H-Antigen.

An Tag 28 der Studie betrug die Radioaktivität im arithmetischen Mittel 5104,33 cpm (Intervall: 593 – 12794,90 cpm) für das Salmonellen-H-Antigen.

Eine positive Reaktion wurde als eine Erhöhung der cpm um mindestens das Dreifache im Vergleich zu den Negativkontrollen definiert.

Der Quotient aus cpm bei Stimulation mit dem spezifischen Antigen und cpm ohne Stimulation (Negativkontrollen) ist der sog. Stimulationsindex (=SI).

Ein SI von größer oder gleich drei ist damit eine positive Reaktion.

Proband-Nr. 5 zeigte auf Stimulation mit Salmonellen-H-Antigen (SI=5,6) den höchsten SI.

Zwei Probanden (Proband-Nr.: 1, 5) waren bereits vor der Verimpfung, also an Tag 0 der Studie, positiv für das Salmonellen-H-Antigen (Proband-Nr.: 1, 5).

Siehe Tabelle 4, Anhang

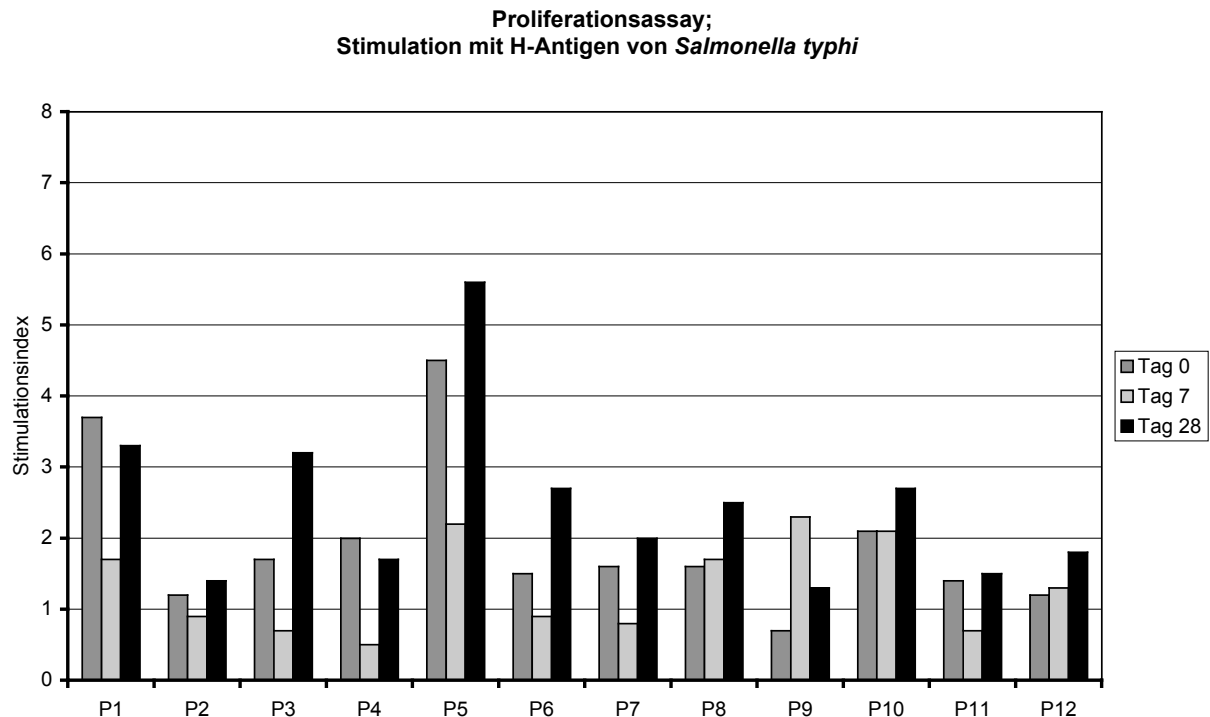


Abb. 9: Proliferationsassay: H-Antigen

4.2.2. Immunreaktion gegen native und rekombinante Urease im Proliferationsassay

Eine signifikante Erhöhung der Radioaktivität, gemessen in cpm als Marker einer spezifischen Reaktion der T-Zellen auf rekombinante und native Urease konnte im Proliferationsassay bei einem von zwölf Probanden nachgewiesen werden (Proband-Nr.: 5; =8,3% der Probanden).

An Tag 0 der Studie betrug die gemessene Radioaktivität bei Proband-Nr. 5 im arithmetischen Mittel 1733,07 cpm für rekombinante Urease und 2189,57 cpm für native Urease.

An Tag 28 wurde dann eine mittlere Radioaktivität von 2889 cpm für rekombinante Urease und 5637,67 cpm für native Urease gemessen.

Der SI betrug bei Proband-Nr. 5 für rekombinante Urease 3,4 und für native Urease 6,5 und lag damit deutlich über dem von uns festgelegten Schwellenwert.

Siehe Tabelle 4, Anhang

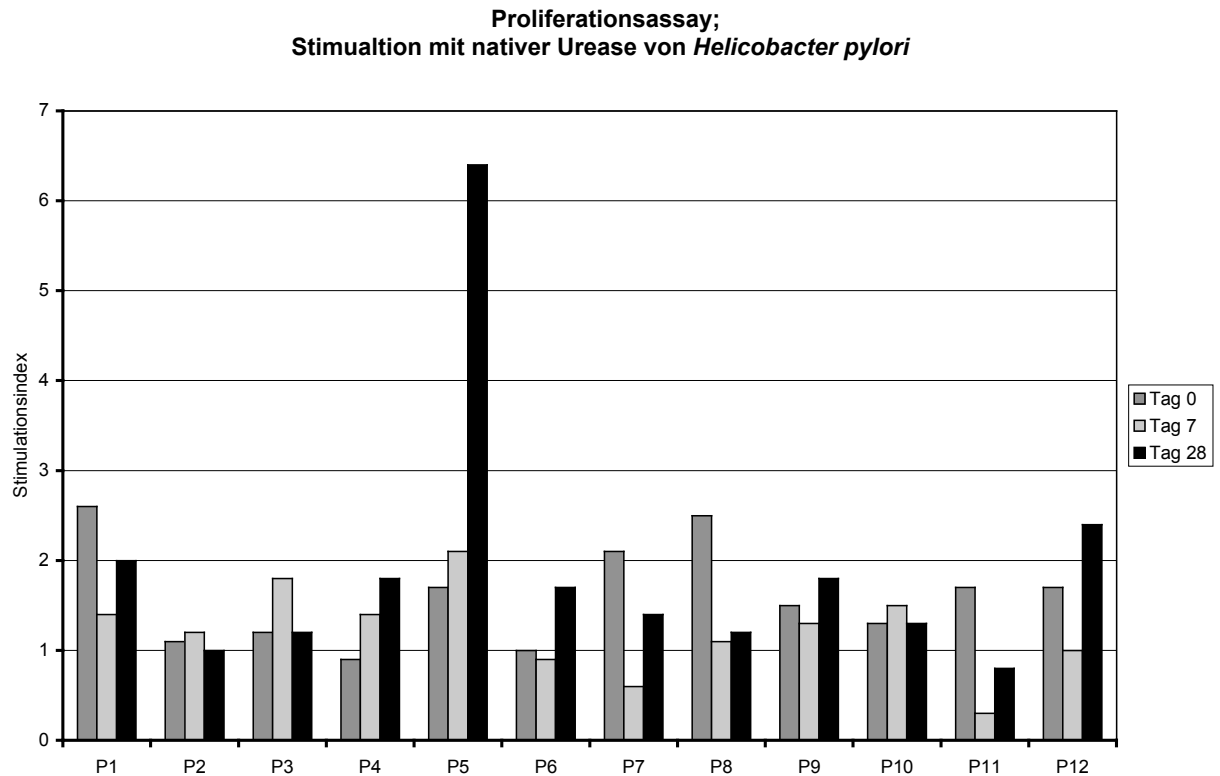


Abb. 10: Proliferationsassay: native Urease

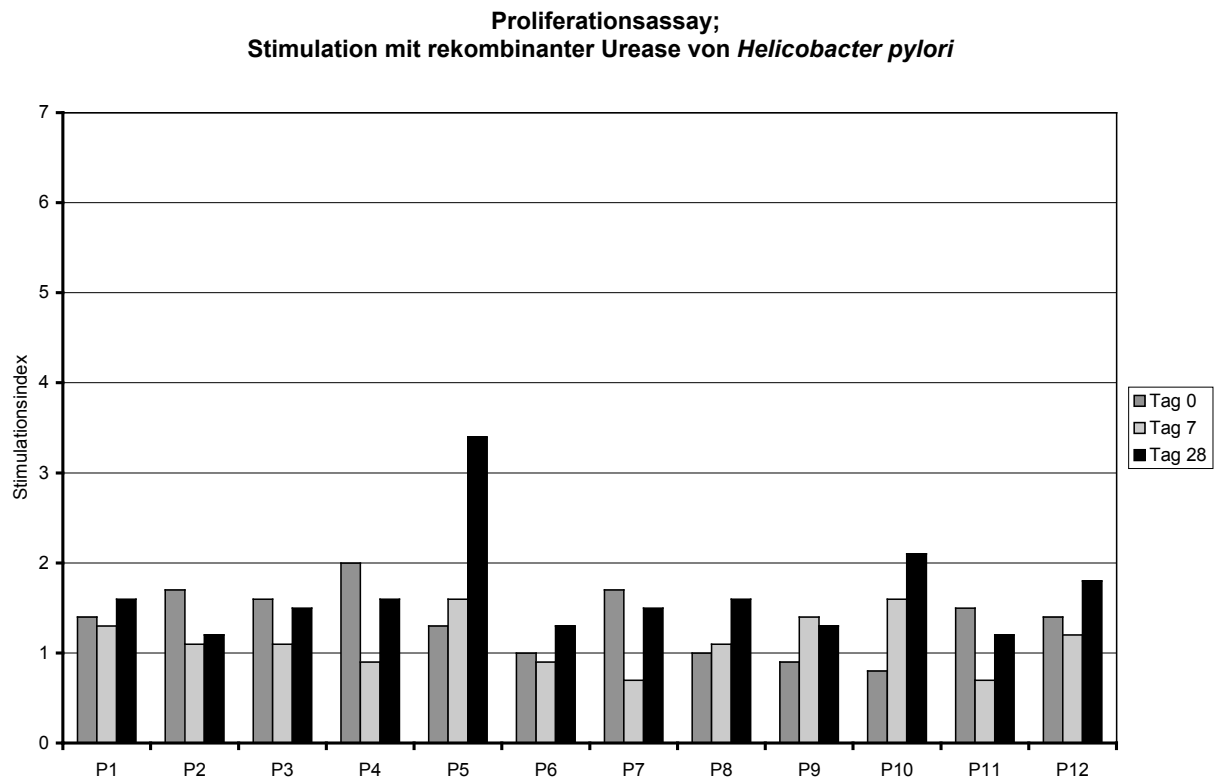


Abb. 11: Proliferationsassay: rekombinante Urease

4.3. Elisa

Zur Auswertung des Elisa wurden Tag 0 und Tag 28 der Studie verglichen.

Als signifikante Erhöhung der IFN- γ Produktion in den Überständen der Proliferationsassays wurde eine Zunahme der OD bei einer Wellenlänge von 450nm um jeweils den Mittelwert plus drei Standardabweichungen der Negativkontrollen gewertet.

4.3.1. IFN- γ Produktion bei Stimulation mit Salmonellen-H-Antigen

Die Quantifizierung der IFN- γ Produktion in den Überständen der Proliferationsassays dient als Nachweis einer spezifischen Stimulation des Salmonellen-H-Antigen.

Die Menge an gebildetem IFN- γ an Tag 0 der Studie wurde hierbei mit der an Tag 28 der Studie verglichen.

An Tag 0 der Studie wurde im Mittel 6 pg/ml IFN- γ bei einer Stimulation mit Salmonellen-H- oder Salmonellen-O-Antigen gebildet (Intervall: 0-104 pg/ml).

Bei drei Probanden (= 25%) konnte an Tag 28 ein signifikanter Anstieg bei Stimulation mit Salmonellen-H-Antigen nachgewiesen werden (Proband-Nr.: 3, 5, 11).

Bei Stimulation mit Salmonellen-H-Antigen lag die IFN- γ Produktion an Tag 28 im Mittel bei 325 pg/ml (Intervall: 115-445pg/ml).

Als signifikant wurde ein Anstieg der IFN- γ Produktion von mehr als 100 pg/ml gewertet.

Ein Anstieg um mehr als 100 pg/ml entspricht dem Mittelwert der negativ Kontrollen (unstimulierte Zellen) plus vier Standardabweichungen.

Signifikante Unterschiede in der IFN- γ Produktion vor und nach Impfung wurden mittels Wilcoxon Rang Summen Test ermittelt.

Siehe Tabelle 5, Anhang

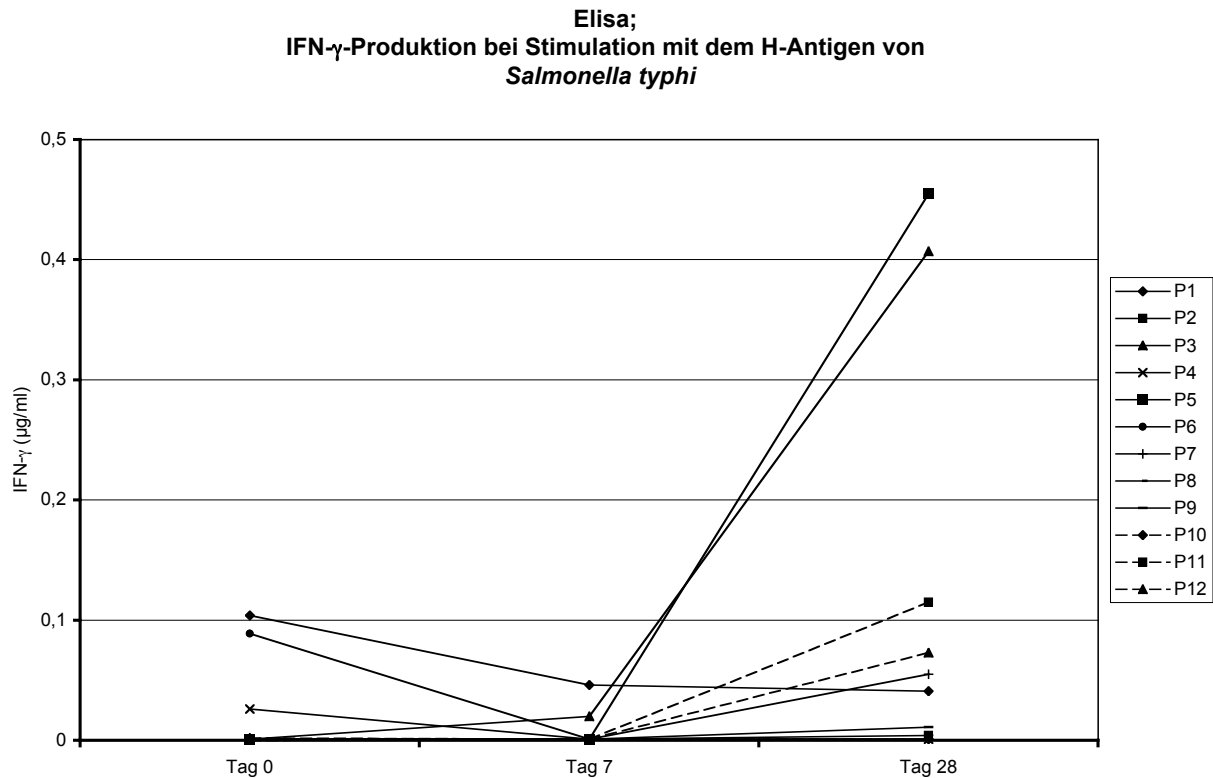


Abb. 22: Elisa: H-Antigen

4.3.2. IFN- γ Produktion bei Stimulation mit nativer oder rekombinanter Urease

Die Quantifizierung der IFN- γ Produktion in den Überständen der Proliferationsassays dient als Nachweis einer spezifischen Stimulation der T-Zellen durch native oder rekombinante Urease.

Bei keinem der Probanden konnte an Tag 28 der Studie im Vergleich zu Tag 0 eine signifikante IFN- γ Produktion bei Stimulation mit rekombinanter Urease festgestellt werden.

Im Durchschnitt betrug die Menge des an Tag 0 gebildeten IFN- γ bei Stimulation mit rekombinanter Urease 3,7 pg (Intervall: 1-26 pg) und 14 pg an Tag 28 der Studie (Intervall: 1-69 pg).

Bei Stimulation mit nativer Urease konnte bei einem (= 8,3%) von 12 Probanden eine signifikante Erhöhung der IFN- γ Produktion nachgewiesen werden (Proband-Nr.: 5). Proband-Nr. 5 hatte an Tag 0 bei Stimulation durch native Urease eine IFN- γ Produktion von 1 pg und an Tag 28 eine IFN- γ Produktion von 581 pg. Dies entspricht einer

Erhöhung von 580 pg/ml.

Als signifikante Erhöhung in der IFN- γ Produktion wurde eine Differenz zwischen Tag 0 und Tag 28 der Studie von mindestens 100 pg/ml gewertet. Dies ergab sich aus Berechnungen mit dem Rangsummentest (Wicoxon).

Siehe Tabelle 5, Anhang

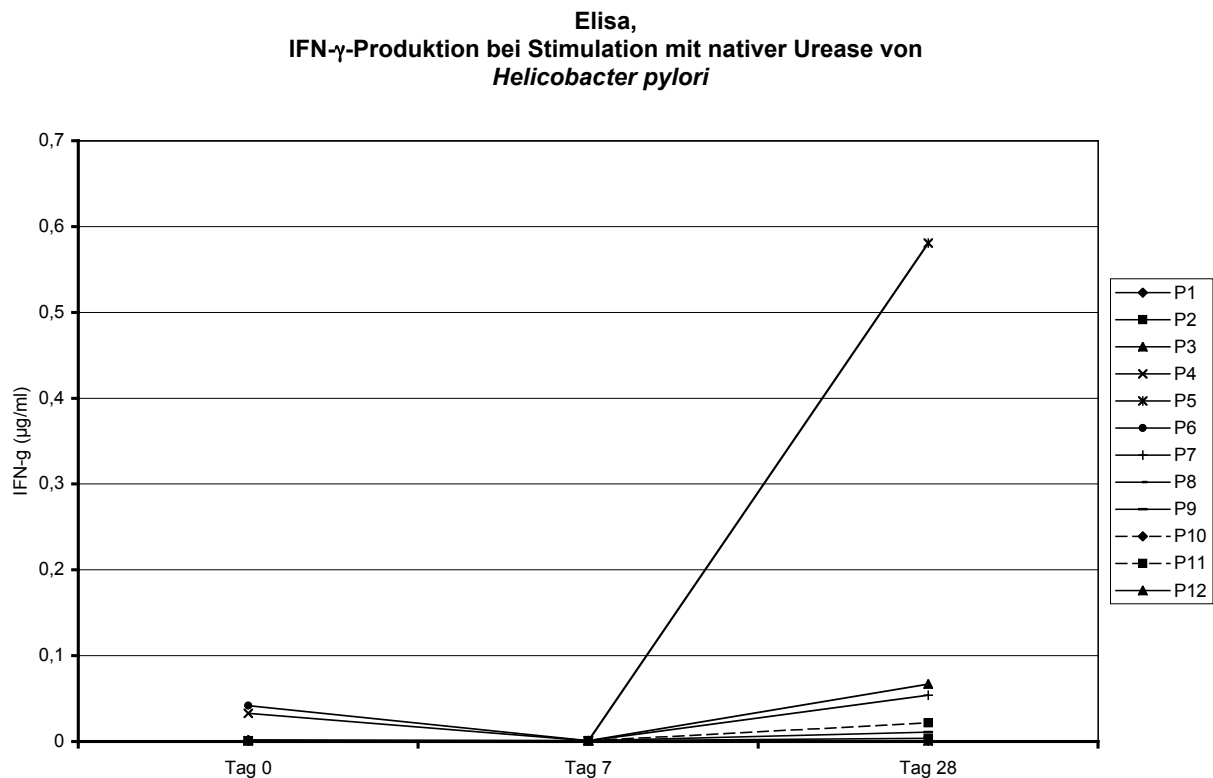


Abb. 13: Elisa: native Urease

IV Diskussion

Der Gesetzgeber fordert für die Zulassung eines neuen Wirkstoffes neben einer analytischen Prüfung und einer pharmakologisch-toxischen Prüfung die klinische Prüfung (Arzneimittelgesetz in der Fassung vom 1. Jan. 2002; §22 Abschnitt 2).

Aus der klinischen Prüfung muß dabei hervorgehen: „ob das Arzneimittel bei dem angegebenen Anwendungsgebiet angemessen wirksam ist, ob es verträglich ist, ob die vorgesehene Dosierung zweckmäßig ist und welche Gegenanzeigen und Nebenwirkungen bestehen (Arzneimittelgesetz in der Fassung vom 1. Jan. 2002; §24 Abschnitt 3). Dazu werden Humanstudien in unterschiedlichem Umfang und unterschiedlicher Zielsetzung durchgeführt (Phase I bis Phase IV Studie).

Die hier vorgestellte Untersuchung gehört dabei zu den Phase I Studien. Eine Phase I Studie stellt eine Erstanwendung eines neuen Wirkstoffes an gesunden Probanden dar. Phase I Studien haben die Zielsetzung, eventuell auftretende schwere Nebenwirkungen aufzudecken, sowie erste Hinweise auf eine wirksame Dosis und die Wirkungsweise des neuen Präparats zu sammeln.

1. Klinische Verträglichkeit und Nebenwirkungsprofil

Der in dieser Untersuchung eingesetzte Impfstoff, bestehend aus dem Impfstamm *S. typhi* Ty21a(pDB1) hat sich in dieser Studie als gut verträglich und damit als relativ nebenwirkungsarm erwiesen.

Diese Aussage basiert zum einen auf der Tatsache, daß zu keinem Zeitpunkt der Untersuchung bei den Studienteilnehmern Beschwerden auftraten, die zur therapeutischen Intervention oder sogar zum Abbruch der Studie gezwungen hätten und zum anderen auf dem Vergleich des Nebenwirkungsprofils von *S. typhi* Ty21a(pDB1) mit den Angaben des Herstellers von Typhoral® L und der Metaanalyse von Engels *et al.*

Der Hersteller des Impfstoffes Typhoral® L (Chiron Behring), aus dem unser Impfstamm *S. typhi* Ty21a(pDB1) entwickelt wurde, gibt als Nebenwirkungen Beschwerden des Magen-Darm-Traktes, wie Übelkeit, Bauchmerzen, Bauchkrämpfe,

Erbrechen und Durchfall an, sowie gelegentliche Allgemeinreaktionen, wie Temperaturerhöhung, Schüttelfrost, Kopfschmerzen, Gliederschmerzen und Unwohlsein.

Aussagen über die Quantität der Nebenwirkungen werden in einer Metaanalyse verschiedener Feldstudien gemacht. In dieser Metaanalyse zur Effektivität und Toxizität von *S. typhi* Ty21a als Impfstoff gegen Typhus bei Beobachtung von insgesamt 11204 Personen ergab sich als Hauptnebenwirkung Diarrhö (5,1 % der Personen) gefolgt von Erbrechen (2,1 % der Personen). Bei 2 % der Probanden konnte Fieber als Nebenwirkung der Impfung festgestellt werden. Kopfschmerzen und unklare abdominelle Beschwerden wurden in dieser Studie als Nebenwirkungen nicht aufgeführt (Engels, Eric A. *et al.* 1998).

Unklare abdominelle Beschwerden und Kopfschmerzen waren die Hauptnebenwirkungen, die im Zeitraum unserer Untersuchung registriert wurden. Dabei wurden unklare abdominelle Beschwerden definiert als subjektive Empfindungen wie z.B. Tenesmen oder abdominelle Schmerzen, die nicht zu Veränderung der Stuhlgewohnheiten (in Form von z.B. Diarrhö, Obstipation), zum Auftreten von Fieber (Körpertemperatur größer 38°C) oder Veränderung der Blutparameter (s. Kapitel 2.1.; S. 31) führten. Eine weitere differentialdiagnostische Abklärung der Kopfschmerzen fand nicht statt, da die Kopfschmerzen bei keinem der Probanden therapeutische Konsequenzen hatte oder länger als einen Tag persistierten.

Über unklare abdominelle Beschwerden klagten zwei von 12 Probanden (=16,7%), über Kopfschmerzen drei der Probanden (= 25%). Einer von 12 Probanden hatte nach der ersten Verimpfung (Tag 0 der Studie) Diarrhö (= 8,3%). Allerdings trat diese Diarrhö bei Proband Nr. 9 auf, der zu der Kontrollgruppe der Studie gehörte, denen nur der Kontrollstamm *S. typhi* Ty21a ohne rekombinante Urease verabreicht wurde. Keines der Symptome persistierte länger als einen Tag und keiner der Probanden benötigte eine Therapie.

Im Vergleich der Ergebnisse unserer Studie mit der Literatur, lassen sich also zwei Aussagen treffen. Erstens hat die genetische Veränderung von *S. typhi* Ty21a –also die Einschleusung eines Plasmids, das Urease von *H. pylori* exprimiert - die Art der Nebenwirkungen nicht verändert. Sämtliche von uns registrierten Nebenwirkungen -

unklare abdominelle Beschwerden, Kopfschmerzen und Diarrhö werden vom Hersteller von Typhoral ebenfalls genannt.

Zweitens ergab unsere Untersuchung keinen Hinweis auf eine deutliche Veränderung der Quantität der Nebenwirkungen. Definitive Aussagen zur Quantität lassen sich allerdings auf Grund der geringen Anzahl an Probanden in einer Phase I Studie nur eingeschränkt treffen.

Im Hinblick auf das Nebenwirkungsprofil erwies sich der Impfstamm *S. typhi* Ty21a(pDB1) somit als gut verträglich. Für eine Anwendung an einer größeren Zahl von Probanden –bzw. in einer Phase 2 Studie– ergeben sich demnach keine Kontraindikationen.

Eine weitere Fragestellung dieser Untersuchung war, ob es durch den Kontakt zwischen Impfstoff *S. typhi* Ty21a(pDB1) und Organismus des Wirtes zu Veränderungen des Impfstoffes und der Plasmidstabilität kommen kann.

Hierzu wurden an den drei Tagen, die auf die letzte Impfung folgten, Stuhlproben gesammelt. Eine Anzüchtung des Impfstammes *S. typhi* Ty21a(pDB1) oder des Kontrollstammes *S. typhi* Ty21a aus dem Stuhl gelang dabei bei keinem der Probanden.

Eine Aussage zur Stabilität des Plasmids oder zu möglichen Veränderungen innerhalb der Bakterienstruktur, bzw. der Pathogenität des Bakteriums, die durch die Interaktion mit dem Wirtsorganismus induziert wurde, kann aus diesem Grund nicht gemacht werden.

Die verabreichte Impfdosis könnte eine mögliche Ursache dafür sein, daß weder Impfstamm noch Kontrollstamm in den Stuhlproben der Probanden angezüchtet werden konnte. $1-5 \times 10^9$ Bakterien des Stammes Ty21a sind notwendig, um eine intestinale Infektion und damit eine Immunantwort des Wirtes auf den Impfstoff zu erzeugen (Herrington, D. A. 1990), aber erst ab einer Impfdosis von 1×10^{10} Bakterien wird von einem Nachweis im Stuhl ausgegangen (Levine, M. M. 1990).

Da in unserer Studie an den drei Impftagen der Studie 6×10^9 (Tag 0), 7×10^9 (Tag 2) und 9×10^9 cfu (Tag 4) verabreicht wurden, lag die Impfdosis zwar immer über der Dosis, die

eine intestinale Infektion verursacht, aber auch immer unter einer Dosis, die einen Nachweis im Stuhl ermöglicht.

Anderen Studien mit rekombinanten *S. typhi* Impfstoffen gelang allerdings ein Nachweis im Stuhl auch schon bei einer verabreichten Impfdosis von 1×10^9 (Tramont, E. C. *et al.* 1984), so daß nicht mit Sicherheit davon ausgegangen werden kann, daß der fehlende Nachweis des Impfstammes *S. typhi* Ty21a(pDB1) oder des Kontrollstammes *S. typhi* Ty21a im Stuhl der Probanden allein mit der verabreichten Dosis zusammenhängt.

Neben der Dosis spielt für den Nachweis im Stuhl noch die Resistenz des Erregers gegenüber den unspezifischen Abwehrmechanismen des menschlichen Körpers –wie z.B. saures Milieu im Magen, Peristaltik des Magen-Darmtraktes usw.- eine Rolle. Als mögliche Ursache des fehlenden Nachweises von Impf- und Kontrollstamm im Stuhl könnte auch eine Schwächung der Erreger durch genetische Veränderung (Einschleusung des Plasmids), Lagerung und Transport in Betracht kommen.

Für Mängel bei Lagerung und Transport ergaben sich keine Hinweise. Impf- und Kontrollstamm wurden simultan zur Impfung ausgestrichen und zeigten keine morphologischen Auffälligkeiten. Eine Schwächung durch eine genetische Veränderung hätte nur den Impfstamm, nicht aber den Kontrollstamm betroffen.

Die Frage nach der Ursache des fehlenden Nachweises von Kontroll- und Impfstamm kann also retrospektiv letztlich nicht geklärt werden. Um die Frage nach der Veränderung des Impfstammes im Kontakt mit den menschlichen Organismus zu beantworten, sollten zukünftige Studien, aufbauend auf den Ergebnissen dieser Untersuchung, eine schrittweise Erhöhung der Impfdosis erproben.

2. Immunogenität des Impfstammes *Salmonella typhi* Ty21a(pDB1)

Das zentrale Thema dieser Untersuchung war die Frage nach der Wirksamkeit des Impfstoffes. Ein Impfstoff ist letztendlich dann wirksam, wenn die Immunantwort des Wirtes so modifiziert wird, daß eine Protektion und/oder Elimination des Erregers möglich ist. Protektion bedeutet, daß ein Schutz gegenüber einer zukünftigen Infektion induziert wird. Elimination bedeutet, daß eine bereits bestehende Infektion geheilt wird.

Eine Phase 1 Studie an gesunden Probanden kann die Frage nach eventueller Protektion oder Elimination eines neuen Impfstoffes nicht definitiv beantworten. Eine Stimulation des Immunsystems des Wirtes und damit das Potential des neuen Impfstoffes lässt sich hingegen an Hand immunologischer Untersuchungen gut erfassen. Insgesamt gibt es in der Literatur drei Modelle eines Impfstoffes gegen *H. pylori*.

Das erste Modell basiert auf dem Prinzip der Verwendung eines aufgereinigten synthetischen Antigens als Impfstoff. Kreiss *et al.* verabreichten als Impfstoff rekombinante Urease an Erwachsene mit asymptomatischer *H. pylori* Infektion (Kreiss, C. *et al.* 1996). Eine Wirksamkeit dieses Impfstoffes gegenüber der *H. pylori* Infektion konnte dabei nicht festgestellt werden.

Das zweite Modell basiert ebenfalls auf der Verwendung eines aufgereinigten synthetischen Antigens als Impfstoff, allerdings in Kombination mit einem Adjuvans zur Verstärkung der Immunantwort. Michetti *et al.* verwendeten in einer Placebo kontrollierten Studie aufgereinigte Urease zusammen mit hitzelabilem Enterotoxin (LT) von *Escherichia coli*. Verabreicht wurde dieser Impfstoff an insgesamt 26 Probanden. Alle Probanden waren zum Zeitpunkt der Studie *H. pylori* positiv aber ohne Anzeichen für Dyspepsie. Von den 15 Probanden, denen Urease von *H. pylori* plus LT von *Escherichia coli* verabreicht wurden (Verum-Gruppe), bekamen fünf Probanden 180mg Urease plus LT, vier Probanden 60mg Urease plus LT und sechs Probanden 20mg Urease plus LT. LT von *Escherichia coli* wurde in jeder Gruppe in einer Menge von 5µg verabreicht. Bei allen Probanden der Verum-Gruppe konnte eine dosisabhängige Zunahme der anti-Urease Serum IgA (Elisa-Test) und der IgA-produzierenden B-Zellen (B-Zell-Elispot) festgestellt werden. Eine Eradikation der *H. pylori* Infektion konnte bei keinem der Probanden festgestellt werden und bei 62,5% der Probanden wurde als Nebenwirkung Diarrhö beobachtet (Michetti, P *et al.* 1999).

Das dritte Modell stützt sich auf die Verwendung eines Vektors, der als carrier für ein Fremdantigen fungiert. Zwei Gruppen entwickelten zeitgleich zu unserer Gruppe einen Impfstoff der als Vektor Salmonella und als Antigen Urease benutzt.

DiPetrillo *et al.* benutzten als Vektor den Salmonellenstamm Ty800, den sie in einer Einmal-Dosis von 1×10^{10} bis 4×10^{10} cfu an insgesamt acht gesunde Probanden verabreichten. Bei keinem der Probanden gelang der Nachweis einer Immunantwort auf das Fremdantigen Urease in Elispot oder Elisa Tests (DiPetrillo, M. D. *et al.* 2000).

Angelakopoulos *et al.* benutzten als Vektor den Salmonellenstamm *S. typhimurium*, der sechs gesunden Probanden in einer Dosis von 5×10^7 bis 8×10^7 verabreicht wurde. Der Impfstoff wurde ebenfalls nur einmalig verabreicht. Hier gelang bei drei Probanden der Nachweis einer Immunreaktion auf das Fremdartigen Urease. Allerdings wurde hier ein Testsystem verwendet, bei dem die PBMZ für 48 Stunden kultiviert wurden. Danach wurden über Elisa die spezifischen AK in den Überständen bestimmt. Nur bei einem der drei Probanden konnte im Elispot und im IgG Elisa (Serum) ein signifikanter Anstieg der spots, bzw. der OD nachgewiesen werden. Bei zwei Probanden, darunter der Proband mit dem positiven Nachweis einer Immunreaktion auf Urease, trat im Anschluß auf die Impfung hohes Fieber auf (Angelakopoulos, H. *et al.* 2000).

In unserer Studie gelang der Nachweis einer Immunantwort gegen den Vektor *S. typhi* bei insgesamt 10 von 12 Probanden. Eine signifikante Reaktion auf das Fremdartigen, native und/oder rekombinante Urease, gelang bei insgesamt 6 von 9 Probanden. Zwei der Probanden (Proband-Nr. 2 und 5) hatten eine verhältnismäßig starke Immunreaktion auf native und/oder rekombinante Urease, bei den vier anderen Probanden (Proband-Nr.: 4, 7, 10, 11) war die detektierte Immunreaktion nur knapp über dem von uns festgelegten Schwellenwert.

Eine zelluläre Immunantwort gegen das eingeschleuste Fremdartigen Urease von *H. pylori* konnte erstmals mit dieser Untersuchung nachgewiesen werden. Dabei ist die zelluläre Immunreaktion für die Elimination und Protektion gegenüber einer Infektion mit *H. pylori* von zentraler Bedeutung (Ermak, T. H. *et al.* 1998; Blanchard, T. G. *et al.* 1999).

Der Nachweis einer humoralen Immunantwort gegen das Fremdartigen Urease von *H. pylori* gelang nicht.

Im Vergleich zu den oben genannten Untersuchungen, ist die Entwicklung eines Impfstoffes als Kombination aus *S. typhi* Ty21a als Vektor und Urease von *H. pylori* als Fremdartigen im Hinblick auf Nebenwirkung und Wirksamkeit damit als Erfolg zu werten.

3. Diskussion der einzelnen immunologischen Testergebnisse

Es wurden jeweils die zelluläre und die humorale Immunantwort auf den Vektor und das Fremdanigen untersucht. Dabei ist der Nachweis einer Immunreaktion gegen den Vektor Grundvoraussetzung für eine Beurteilung der Immunreaktion gegen das Fremdanigen Urease von *H. pylori*.

3.1. Humorale Immunantwort gegen den Vektor *Salmonella typhi* Ty21a

Es wurden zwei Methoden für die Untersuchung der humoralen Immunantwort verwendet. Zum einen der direkte Nachweis spezifischer Plasmazellen im peripheren Blut mittels B-Zell-Elispot, zum anderen die Untersuchung der spezifischen Antikörper im Serum mittels Elisa.

Der B-Zell-Elispot erfaßt Plasmazellen, die nach dem ersten Antigenkontakt, also nach der Ausdifferenzierung von der naiven B-Zelle bis zur antikörpersezernierenden Plasmazelle, bzw. B-Gedächtniszelle, vom lokalen Lymphknoten über den ductus thoracicus und die Blutstrombahn auf dem Weg zurück zum Ort des Infektionsgeschehen sind (sog. Homing).

Im B-Zell-Elispot konnte eine Immunantwort auf Salmonellen-O-Antigen bei neun Probanden (Proband-Nr.: 2-4, 6-8, 10-12) und auf das Salmonellen-LPS-Antigen bei 10 (Proband-Nr.: 1-4, 6-8, 10-12) von 12 Probanden nachgewiesen werden.

Dies entspricht einer Rate von 83% für Salmonellen LPS und 75% für das Salmonellen-O-Antigen.

36 spots/Mio.PBMZ wurden im arithmetischen Mittel an Tag 7 der Studie bei Stimulation mit dem O-Antigen von *S. typhi* detektiert (Streubreite: 4-387 spots/Mio.PBMZ) und 84 spots/Mio. PBMZ bei Stimulation mit dem Salmonellen-LPS-Antigen (Streubreite: 8-352 spots/Mio. PBMZ).

Die Anzahl der spots/Mio. PBMZ in dieser Untersuchung ist in Übereinstimmung mit den Angaben in der Literatur. Allerdings variieren die Zahlen in der Literatur stark, was u.a. verursacht wird durch die unterschiedlichen Dosierungen des Impfstoffes, den

Unterschieden bei den Messungen (z.B. ASZ, die IgA produzieren, oder alle ASZ), oder den Unterschieden in der Methode (Inkubationszeit usw.).

Ein Überblick zum Elispot gibt eine Metaanalyse, in der eine Variation der gemessenen spots von „weniger als 10“ bis mehreren tausend spots beschrieben wird (Arvilommi, H. 1996).

In zwei vergleichbaren humanen Impfstudien wurden Elispots zum Einsatz gebracht. In beiden Untersuchungen wurde ein Impfmodus (Verabreichung des Impfstoffes als Suspension und an drei Tagen) verwendet, der mit unserem Impfmodus identisch ist.

In der ersten Studie wurde der Impfstamm *S. typhi* Ty21a an 10 gesunde Probanden verabreicht. Geimpft wurde an drei Tagen mit einem Abstand von 48 Stunden zwischen jeder Impfung. Ein signifikanter Anstieg der auf das O-Antigen von *S. typhi* spezifischen ASZ konnte bei 8 von 10 Probanden nachgewiesen werden. An Tag 7 waren im Mittel 6 spots/Mio.PBMZ detektierbar bei einer Streubreite von 0,25 bis 143 spots/Mio.PBMZ (Kantele, A. *et al.* 1986).

In der zweiten Studie, ebenfalls von Kantele *et al.*, wurde derselbe Impfstamm an insgesamt 126 gesunde Erwachsene in verschiedenen Darreichungsformen (Suspension, Gelatinkapsel, enteric coated capsule) verabreicht. In der Probandengruppe (20 Personen), die den Impfstoff an drei Tagen mit einem Abstand von 48 Stunden bekamen, wurden im Mittel auf das O-Antigen von *S. typhi* 178 spots/Mio.PBMZ an Tag 7 festgestellt. Die Streubreite der spots/Mio.PBMZ war hoch. Alle 20 Probanden hatten an Tag 7 der Studie einen signifikanten Anstieg der spezifischen ASZ (Kantele, A. 1990).

Beide Studien zeigen, daß -trotz gleichem Untersucher und gleichem Impfmodus- die Anzahl der detektierten spots sehr variiert und damit eine Aussage über die Wirksamkeit anhand der Anzahl der spots nicht möglich ist. Durch die beiden Studien kann allerdings belegt werden, daß es in unserer Studie durch Transport, Lagerung, Verabreichung und Einbau des rekombinanten Antigens nicht zu einer wesentlichen Beeinträchtigung des Impf- oder Kontrollstammes gekommen ist.

Der Vergleich der Ergebnisse der Probanden, die den Impfstamm bekamen (Verum-Gruppe) mit denen der Kontrollgruppe zeigte, daß die Integration der Urease in das Genom von *S. typhi* Ty21a die Immunogenität des Impfstoffes nicht beeinflußt hat. So gelang in der Verum-Gruppe der Nachweis einer humoralen Immunantwort gegen Vektorantigene bei 8 von 9 Probanden.

Ein deutlich verminderte Anzahl an Spots im B-Zell-Elispot – als Zeichen einer verminderten Immunität des Impfstamms- bei Vergleich von Verum-Gruppe zur Kontroll-Gruppe konnte ebenfalls nicht festgestellt werden.

Die große Streubreite in der Anzahl der spots/Mio. PBMZ im B-Zell-Elispot an Tag 7 der Studie - zwischen 17 und 387 spots/Mio. PBMZ für das Salmonellen-O-Antigen und 15 bis 352 spots/Mio. PBMZ für Salmonellen-LPS- spiegelt die Unterschiedlichkeit der einzelnen Probanden wieder. So ist die Immunantwort gemessen an den ASZ bei denjenigen Probanden mit relativ niedriger Anzahl an spots/Mio. PBMZ für das Salmonellen-O-Antigen auch meist niedrig für das Salmonellen-LPS. Zum Beispiel hat Proband-Nr. 7 sowohl für das Salmonellen-O-Antigen als auch für Salmonellen-LPS eine relativ geringe Anzahl an spots/Mio. PBMZ (17, bzw. 16 spots/Mio. PBMZ) während die Immunantwort für beide Antigene bei Proband 3 relativ hoch ist (387, bzw. 288 spots/Mio. PBMZ). Dies zeigt, daß Proband-Nr. 7, bezogen auf die Salmonellen-Antigene, relativ schwächer reagiert als Proband Nr. 3.

Proband-Nr. 1 reagierte im B-Zell-Elispot auf LPS nicht aber auf das O-Antigen von *S. typhi*. Die wahrscheinlichste Erklärung dafür ist, daß Proband-Nr. 1 auf ein anderes Epitop als das O-Antigen innerhalb des LPS-Moleküls reagiert hat.

Das LPS-Molekül setzt sich zusammen aus drei Anteilen: dem Lipoid A (Fettsäuren, Diglucosamin, Phosphat), dem Kern-Polysaccharid oder „core“ (v.a. Hepatosen) und der O-spezifischen Polysaccharidkette (repetierende Einheiten aus 3-8 Zuckern) oder dem sog. O-Antigen (Kayser, F. H. *et al.* 1998).

Eine Immunreaktion gegen das LPS-Molekül muß also nicht gegen das O-Antigen gerichtet sein.

Der zweite Test zur Beurteilung der humoralen Immunreaktion auf den Vektor ist der enzyme-linked immunosorbent assay (Elisa).

Im Elisa gelang der Nachweis einer Immunreaktion auf die Antigene des Vektors bei zwei Probanden (Proband-Nr. 3 und 11). Nachgewiesen wurde eine Erhöhung der Antikörper der Klasse IgG im Serum der Probanden. Als Antigen des Vektors wurden Salmonellen-LPS und Salmonellen-O-Antigen getestet.

Proband-Nr. 5, der vor der Studie bereits gegen Typhus mit Typhoral® geimpft wurde, hatte an Tag 0 der Studie im Elisa-Test Werte oberhalb des von uns definierten Schwellenwertes. Proband-Nr. 2, der die Typhoral® -Schluckimpfung ebenfalls erhalten hatte, zeigte keine Immunreaktion im Elisa. Dies ist im Einklang der Literatur, in der beschrieben wird, daß bei einem Drittel der Personen, die eine Typhoral® -Schluckimpfung erhalten haben, eine spezifische Immunantwort nicht nachgewiesen werden kann (Levine, M. M. *et al.* 1987).

Die bereits vorgestellten Studien von Kantele *et al.* sowie eine Studie, in der Salmonella ebenfalls als Vektor für ein Fremdanigen benutzte wurde, bieten sich zum Vergleich der Elisa-Ergebnisse mit der Literatur an.

So ermittelten Kantele *et al.* neben den Untersuchungen der spezifischen ASZ in beiden Studien die Anzahl der Probanden bei denen eine Serokonversion festgestellt werden konnte. In der ersten Studie hatten bei Verabreichung von *S. typhi* Ty21a an zehn gesunde Probanden zwar acht Probanden einen signifikanten Anstieg der spezifischen ASZ, jedoch konnte bei keinem der Probanden spezifische Antikörper im Serum gefunden werden (Kantele, A. *et al.* 1986).

In einer weiteren Studie an 126 gesunden Probanden konnten A. Kantele bei 20 von 20 Probanden einen Anstieg spezifischer ASZ gegen Antigene von *S. typhi* nachweisen, allerdings nur bei 16 von 20 Probanden eine Serokonversion spezifischer IgG. Auffällig in dieser Studie war, daß nur bei Probanden mit hoher Anzahl an gemessenen spezifischen ASZ ein Nachweis spezifischer Antikörper im Serum gelang (Kantele, A. 1990).

Mit einem Typhoid-Cholera-Hybrid-Impfstoff, der an 14 Personen in einer Dosis von 1×10^{10} lebensfähige Bakterien an drei aufeinander folgenden Tagen verabreicht wurde, konnte der Nachweis einer signifikanten Erhöhung spezifischer Antikörper der Klasse IgG bei allen Probanden erbracht werden (Tacket, C. O. *et al.* 1990).

Im Vergleich unserer Studie zu der Studie von Carol O. Tacket fällt auf, daß die Rate an Serokonversionen bei Carol O. Tacket *et al.* signifikant höher liegt. Eine mögliche Ursache hierfür könnte die höhere Anzahl an verabreichten Bakterien sein.

Im Gegensatz dazu korrelieren unsere Ergebnisse gut mit denen von A. Kantele *et al.*

Wie in unserer Studie reagieren auch bei Kantele *et al.* deutlich weniger Probanden bei den Elisa Untersuchungen als im Elispot.

Hierfür gibt es zwei Erklärungen. Erstens ist der B-Zell-Elispot in der Methode sensitiver. Ein Nachweis einer spezifischen Reaktion gegen ein Fremdanigen oder einen Impfstoff gelingt also unterhalb der Nachweisgrenze herkömmlicher Elisas. Zweitens weisen Untersuchungen darauf hin, daß das Immunsystem in ein systemisches und ein mukosales Kompartiment unterteilt werden kann (Arvilommi, H. 1996). Als mukosales Kompartiment wird hier der Respirationstrakt und der Gastrointestinaltrakt angesehen.

Die Immunantwort im mukosalen Kompartiment unterscheidet sich fundamental von der Immunantwort an anderen Stellen des Körpers (Abbas, A. K. *et al.* 1996). So führt eine Infektion, die hauptsächlich das mukosale Kompartiment betrifft, zu einer Immunantwort, die sich hauptsächlich auf das mukosale Kompartiment beschränkt. Eine solche Immunantwort ist damit zwar vorhanden aber nicht notwendigerweise im systemischen Kompartiment nachweisbar (Kantele, A. *et al.* 1997; Arvilommi, H. 1996).

Im Einklang mit den Ergebnissen unserer Studie zeigte sich bei Kantele *et al.* eine Serokonversion abhängig von der Anzahl der detektierten spezifischen ASZ im Elispot. Eine Serokonversion spezifischen IgGs im Elisa konnte nur oberhalb einer gewissen Anzahl an detektierten spots im B-Zell-Elispot nachgewiesen werden. In unserer Untersuchung konnte eine Serokonversion bei den beiden Probanden festgestellt werden, die mit 387 (Proband Nr. 3), bzw. 205 spots/Mio.PBMZ (Proband Nr. 11) ebenfalls die höchsten Werte im B-Zell-Elispot aufwiesen.

Daß die Probanden 1, 2, 4, 6, 7, 8, 10 und 12 im B-Zell-Elispot auf LPS, bzw. auf das O-Antigen von *S. typhi* reagieren aber keine Reaktion im Elisa zeigen (d.h. keine nachweisbaren IgG Antikörper im Serum haben), könnte also daran liegen, daß bei diesen Probanden die Immunantwort sich auf den Ort der Infektion, also die intestinale Mucosa, beschränkt hat.

Bei Proband 3 und 11 war im Gegensatz dazu die Immunantwort so stark, daß sie sich

nicht ausschließlich auf die intestinale Mucosa beschränkte, sondern auch systemisch manifest wurde und damit ein Antikörpernachweis im Serum gelang. Beide Probanden gehören der Verum-Gruppe an. Hinweise auf eine eventuelle Schwächung der Immunogenität des Impfstammes ergaben sich hier also ebenfalls nicht.

Eine humorale Immunreaktion gegen den Vektor läßt sich also bei 10 von 12 Probanden nachweisen. Acht dieser Probanden gehören der Verum-Gruppe an, denen der Impfstoff *S. typhi* Ty21a(pDB1) verabreicht wurde und zwei Probanden gehörten der Kontrollgruppe an, denen der Kontrollstamm *S. typhi* Ty21a verabreicht wurde. Bei Proband Nr. 5 und Nr. 9 läßt sich weder im sensitiven B-Zell-Elispot noch im Elisa eine Immunantwort auf den Vektor detektieren.

Der Nachweis einer humoralen Immunreaktion beweist, daß es Impf- und Kontrollstamm gelang, die Mechanismen der unspezifischen Immunantwort zu überwinden (wie z.B. Mucosa-Barriere, Komplement-System) und die spezifische Immunantwort zu stimulieren.

Der Nachweis einer Immunreaktion gegen Antigene des Vektors bedeutet dabei, daß auch das Fremdanigen Urease von *H. pylori* in Kontakt zur Immunantwort des Wirtes gekommen ist. Eine spezifische Immunreaktion gegen Urease ist damit wahrscheinlich.

Die genetische Veränderung, d.h. die Einschleusung eines Urease exprimierenden Plasmids in das Genom von *Salmonella typhi* Ty21a, hat nicht zu einer signifikanten Verminderung der Immunogenität des Impfstammes geführt. Aus dem Vergleich mit der Literatur ergeben sich allerdings Hinweise darauf, daß die Immunreaktion gegen *S. typhi* noch hätte gesteigert werden können. Ob dies durch eine Erhöhung der Impfdosis zu erreichen ist und ob sich bei einer Dosisveränderung das Nebenwirkungsprofil ändert, wäre eine interessante Fragestellung für zukünftige Studien.

3.2. Zelluläre Immunantwort gegen den Vektor *Salmonella typhi* Ty21a

Zur Anwendung kamen hier T-Zell-Elispot, Proliferationsassay, und die Messung der IFN- γ Produktion in den Überständen.

Alle drei angewendeten Testsysteme weisen aktivierte T-Lymphozyten im peripheren Blut nach, die spezifisch für Antigen des Vektors *S. typhi* sind. Allgemein geht man dabei davon aus, daß nach dem ersten Antigenkontakt der naiven T-Zelle im regionalen das Infektionsgebiet drainierenden Lymphknoten, also nach der klonale Expansion und der Differenzierung in die Effektorzellen, die T-Lymphozyten ähnlich wie die B-Zellen über den Ductus thoracicus und die Blutbahn zurück zum Ort der Infektion wandern (sog. Homing). Bei einer erneuten Stimulation mit dem für den Klon spezifischen Antigen in vitro kommt es wiederum zu einer klonalen Expansion und Sekretion von Zytokinen.

T-Zellen, die spezifisch auf Antigen des Vektors *Salmonella typhi* oder auch auf das Fremdanigen Urease von *H. pylori* reagieren, lassen sich damit u.a. über den Nachweis einer Proliferation (Proliferationsassay) bzw. der Sekretion von Zytokinen (T-Zell-Elispot, IFN- γ Elisa) bei spezifischer Stimulation nachweisen.

Im Proliferationsassay wurde die spezifische zelluläre Immunantwort über die Einlagerung von radioaktiv markierten Thymidin in das Genom gemessen.

Im T-Zell-Elispot und IFN- γ Elisa wurde eine spezifische zelluläre Immunantwort über die Detektion IFN- γ produzierender Zellen (T-Zell-Elispot) oder von IFN- γ (IFN- γ Elisa) nachgewiesen.

IFN- γ wird von T-Helfer-Zellen des Subsets T_H0 und T_H1 und fast allen zytotoxischen-T-Zellen gebildet. Die Transkription des Gens für die IFN- γ Produktion beginnt direkt als Konsequenz der Antigenaktivierung und wird durch IL-2 und IL-12 erhöht.

In einem geringen Maß wird IFN- γ auch von NKZ gebildet. Die T_H1 -Zellen spielen eine maßgebliche Rolle bei der zellvermittelten Immunität und der Überempfindlichkeitsreaktion vom verzögerten Typ, die oft nach Infektion mit intrazellulären Mikroorganismen angetroffen werden (Abbas, A. K. 1996).

S. typhi gehört zu den intrazellulären Erregern (Finlay, B. B. et al. 1989). Eine Infektion mit *S. typhi* führt damit zu einer T_H1 basierten Immunantwort, die u.a. durch die Produktion von IFN- γ nachweisbar ist (Mutoliala, A. et al. 1990; Kagaya, K. et al. 1989).

Eine T_H1 basierte Immunantwort führt über die Produktion spezifischer Zytokine durch antigenaktivierte T-Helfer-Zellen u.a. zu einer IgG2a dominierten Antikörperantwort, zu

einer Aktivierung von Makrophagen, neutrophilen Granulozyten, natürlichen Killer Zellen und zytotoxischen T-Zellen. Die Zytokine, die dies bewirken, sind v.a. IFN- γ und IL 2.

Der Nachweis von signifikanten Mengen IFN- γ in den Überständen des Proliferationsassays oder von IFN- γ produzierenden Zellen im T-Zell-Elispot zeigt damit, daß spezifische T-Zellen auf das spezifische Antigen reagieren und daß eine Entzündungsreaktion vom T_H1 Typ vorhanden ist.

Der erste Test zur Untersuchung der zellulären Immunantwort ist der T-Zell-Elispot. Im T-Zell-Elispot wurde als Vektor-Antigen das H-Antigen von *S. typhi* getestet.

Bei zwei Probanden gelang dabei ein positiver Nachweis spezifischer T-Zellen bei Stimulation mit dem H-Antigen von *S. typhi* (Proband-Nr.: 2, 10). Beide Probanden gehören der Verum-Gruppe an.

Eine mögliche Erklärung für die relativ geringe Anzahl der Probanden, die auf das H-Antigen reagiert haben, ist, daß das H-Antigen von *S. typhi* die Fähigkeit von Monozyten/Makrophagen, Antigene zu präsentieren, vermindert. Timothy L. Wyant *et al.* konnten zeigen, daß bei Inkubation der PBMZ mit *S. typhi* flagella (entspricht dem H-Antigen) Monozyten/Makrophagen deutlich weniger in der Lage waren, lösliche Antigene aufzunehmen und daß der Oberflächenmarker CD 54, der als kostimulatorisches Signal auch bei der APZ vermittelten Stimulation der T-Helfer Zellen eine Rolle spielt, stark vermindert exprimiert wurde (Wyant, T. L. *et al.* 1999).

Allerdings wurde das H-Antigen von *S. typhi* deshalb als Testantigen verwendet, da es zur Feindiskriminierung der Salmonellen verwendet wird (Kauffmann-White-Schema) und deshalb als immunogenes Antigen bekannt ist. Als Peptid und damit als Thymus-abhängiges Antigen ist das H-Antigen auch potentiell in der Lage eine zelluläre Immunantwort zu stimulieren.

Andere Gruppen konnten so auch eine starke Antikörperproduktion und zelluläre Immunreaktion und somit eine starke Immunität gegen dieses Antigen nachweisen (Hone, D.M. *et al.* 1992; Tacket, C. O. *et al.* 1992; Sztein, M. B. *et al.* 1994).

Eine zelluläre Immunreaktion gegen andere Antigene des Vektors als das H-Antigen und eine zelluläre Immunreaktion der T_H2 Subpopulation, konnte mit dem T-Zell-Elispot unserer Konfiguration nicht gemessen werden. Es ist deshalb möglich, daß noch andere Probanden eine zelluläre Immunantwort gegen den Vektor aufwiesen, die mit diesem Test aber nicht erfaßt wurde

Arbeiten, die ebenfalls den T-Zell-Elispot verwendeten, um die zelluläre Immunantwort auf eine Impfung mit Salmonellen zu messen, konnten in der Literatur nicht gefunden werden. Ein direkter Vergleich unserer Ergebnisse mit den Arbeiten anderer Gruppen ist deshalb nicht möglich.

Der zweite Test zur Untersuchung der zellulären Immunantwort ist der Proliferationsassay. Im Proliferationsassay konnte bei drei Probanden ein signifikanter Anstieg der cpm nach Stimulation mit dem H-Antigen von *S. typhi* nachgewiesen werden (Proband-Nr.: 1, 3, 5; = 25%). Proband Nr. 3 und 5 gehören der Verum-Gruppe an und Proband Nr. 1 der Kontrollgruppe.

Bei Untersuchung der zellulären Immunität gegen den Vektor haben damit in den beiden zur Anwendung gebrachten Untersuchungsmethoden –T-Zell-Elispot und Proliferationsassay- unterschiedliche Probanden auf die Stimulation mit dem H-Antigen von *S. typhi* reagiert. Auf den ersten Blick wäre ein paralleles Ergebnis beider Untersuchungsmethoden zu erwarten, da beide Testsysteme die Reaktion der T-Zellen auf Stimulation mit einem Antigen messen. Es muß jedoch in Betracht gezogen werden, daß die beiden Testsysteme völlig unterschiedliche Parameter messen.

So erfaßt der Proliferationsassay im Gegensatz zum T-Zell-Elispot nicht nur die T-Helfer-Zellen des Subsets T_H1 sondern alle antigenstimulierten und sich teilenden Zellen. Zudem konnte nachgewiesen werden, daß Effektor-T-Zellen bei längerem Kontakt mit einem Antigen untergehen (Iezzi, G. *et al.* 1998). Eine mögliche Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse der beiden Tests wäre also auch darin zu suchen, daß T-Zell-Elispot und Proliferationsassay unterschiedliche Populationen von T-Helfer-Zellen erfassen, da der Proliferationsassay eine erheblich längere Inkubationszeit mit dem Antigen aufweist als der T-Zell-Elispot.

An Tag 0 der Studie waren zwei Probanden bei Stimulation mit dem H-Antigen positiv (Proband-Nr. 1 und 5).

Proband-Nr. 5 hatte in der Anamnese eine Typhoral-Schluckimpfung. Eine bereits existierende Immunität war damit zu erwarten. Weshalb Proband-Nr. 1 positiv reagierte ist nicht klar. Eine Impfung mit Typhoral® oder eine Infektion mit *S. typhi* läßt sich anamnestisch nicht ermitteln. Eine subklinische Infektion mit *S. typhi* könnte jedoch eine mögliche Erklärung für eine bereits an Tag 0 nachweisbare Immunität sein.

Auch Proband-Nr. 2 hatte in der Anamnese eine Typhoral®-Schluckimpfung, zeigte aber im Proliferationsassay keine Immunreaktion. Dies ist im Einklang der Literatur, in der beschrieben wird, daß bei einem Drittel der Personen, die eine Typhoral®-Schluckimpfung erhalten haben, eine spezifische Immunantwort nicht nachgewiesen werden kann (Levine, M. M. *et al.* 1987).

In der Literatur gibt es eine Studie, die die zelluläre Immunreaktion auf eine Impfung mit *S. typhi* mittels Proliferationsassay untersucht.

Sztein, M. B. *et al.* verabreichten den Salmonellenstamm *S. typhi* CVD 906 in einer zweimaligen Dosis von 5×10^7 an neun Probanden und den Salmonellenstamm *S. typhi* CVD 908 in einer einmaligen Dosis von 5×10^7 an sechs Probanden. In einer dritten Gruppe, bestehend aus 10 gesunden erwachsenen Probanden wurde als Impfstoff *S. typhi* CVD 908-CSP benutzt. Dieser Impfstamm trägt an seiner Oberfläche als Fremdartigen das „circumsporozoite protein“ von *Plasmodium falciparum*. Der Trägerstamm ist *S. typhi* CVD 908. Eine Dosis von jeweils 5×10^7 Bakterien wurde zu zwei Zeitpunkten - an Tag 0 und 8 der Studie – verabreicht.

Die durchgeführten Untersuchungen beinhalteten die proliferative Antwort der PBMC auf Stimulation mit Salmonellen-H-Antigen und einem Lysat aus *S. typhi* Bakterien.

Bei Impfung mit *S. typhi* CVD 906 gelang der Nachweis einer Immunreaktion auf das H-Antigen bei sieben von neun Probanden (entspricht 78 % der Probanden).

In der Gruppe mit der Verimpfung von *S. typhi* CVD 908 konnte eine signifikante Erhöhung der cpm bei fünf von sechs Probanden (83 %) für das H-Antigen von *S. typhi* nachgewiesen werden.

Bei Verimpfung des rekombinanten Impfstoffes *S. typhi* CVD-CSP gelang ein Nachweis einer Reaktion auf das H-Antigen bei 10 von 10 Probanden (Sztein, M. B. *et al.* 1994).

Vergleicht man diese Daten mit den Daten unserer Studie, so ist der Nachweis einer Immunreaktion bei Stimulation mit Salmonellen-H-Antigen bei 25% (3 von 12 Probanden) in unsere Studie deutlich geringer als bei Sztein, M. B. *et al.*

Zwei Punkte lassen sich als Erklärung hierfür finden. Erstens ist das H-Antigen beider Studien nicht identisch. In unserer Studie wurden Antigene der Firma Sifin benutzt, während Sztein *et al.* ein selbst hergestelltes Lysat benutzten.

Zweitens gilt der Salmonellenstamm CVD als stärker immunogen als der Salmonellenstamm *S. typhi* Ty21a (Levine, M.M. *et al.* 2001, Tacket., C.O. *et al.* 1992).

Im Vergleich beider Studien ergibt sich aber dennoch der Hinweis darauf, daß eine stärkere Stimulation des Immunsystems durch Veränderung des Impfsystems möglich wäre. Neben der bereits besprochenen Möglichkeit der Erhöhung der Impfdosis für unseren Impfstamm *S. typhi* Ty21a(pDB1), darf ein Wechsel des Vektors nicht völlig unbeachtet bleiben. Interessant ist hierbei die Tatsache, daß Sztein *et al.* eine deutlich geringere Impfdosis verwenden (einmalige Verimpfung von 5×10^7 Bakterien) aber dennoch eine stärkere Stimulation des Immunsystems erreichen. Ein Impfstoff mit *S. typhi* CVD als Vektor und Urease von *H. pylori* als Fremdanigen könnte also bei geringerer Impfdosis zu einer stärkeren Stimulation des Immunsystems führen.

Der dritte Test zur Beurteilung der zellulären Immunantwort gegen den Vektor ist der IFN- γ Elisa. Der IFN- γ Elisa untersucht die Menge an gebildetem IFN- γ in den Überständen des Proliferationsassays.

Bei drei von 12 Probanden (25%) konnte ein signifikanter Anstieg der IFN- γ Produktion bei Stimulation mit dem H-Antigen von *S. typhi* nachgewiesen werden (Proband-Nr.: 3, 5, 11). Im arithmetischen Mittel lag die IFN- γ Produktion bei Stimulation mit dem H-Antigen von *S. typhi* bei 325 pg/ml (Intervall: 115-445 pg/ml).

Im Vergleich zwischen IFN- γ Elisa und dem Proliferationsassay fällt auf, daß Proband-Nr. 1 nur im Proliferationsassay, nicht jedoch im IFN- γ Elisa auf Stimulation mit dem Salmonellen-H-Antigen reagiert. Umgekehrt reagiert Proband-Nr. 11 nur im IFN- γ Elisa, nicht aber im Proliferationsassay auf Stimulation mit dem Salmonellen-H-Antigen.

Ein paralleles Ergebnis wäre zu erwarten gewesen, da beide Systeme die zelluläre Immunreaktion auf ein spezifisches Antigen messen und –anders als beim Vergleich zwischen T-Zell-Elispot und Proliferationsassay- hier die Inkubationszeit und das Material identisch sind. Allerdings erfaßt der IFN- γ Elisa ausschließlich T-Lymphozyten, die der T_H1 Subpopulation angehören. Spezifische T-Lymphozyten des Subsets T_H2 könne im Proliferationsassay zwar erfaßt werden, nicht jedoch im IFN- γ Elisa.

Die Unterschiede in den Ergebnissen könnten auch im unterschiedlichen Nachweisverfahren liegen (der Nachweis von IFN- γ mittels Elisa gegenüber Messung der Proliferation mittels Thymidineinlagerung).

In Übereinstimmung mit unserem Studienaufbau wurde in der bereits vorgestellten Studie von Sztein, M. B. *et al.* der Proliferationsassay ebenfalls mit dem IFN- γ Elisa kombiniert.

Dabei hatten in der Studie von Sztein, M. B. *et al.* vier von neun Probanden bei Impfung mit *S. typhi* CVD 906 eine signifikante IFN- γ Produktion bei Stimulation mit dem H-Antigen. Die absoluten Werte lagen hier bei durchschnittlich 649 pg/ml mit einer Standardabweichung von 309 pg/ml.

Bei Impfung mit *S. typhi* CVD 908 konnte bei vier von sechs Probanden eine signifikante IFN- γ Produktion bei Stimulation mit dem H-Antigen nachgewiesen werden mit einem Durchschnittswert von 183 pg/ml und einer Standardabweichung von 58 pg/ml.

In der letzten Impfgruppe - geimpft wurde der rekombinante Stamm *S. typhi* CVD 908-CSP - gelang der Nachweis einer signifikanten IFN- γ Produktion bei Stimulation mit dem H-Antigen bei drei von vier Probanden. Der Mittelwert lag hier bei 177 pg/ml, die Standardabweichung bei 51 pg/ml.

Wie bereits bei dem Vergleich der Proliferationsergebnisse beider Untersuchungen, so reagieren auch im Vergleich der IFN- γ Elisas in unserer Untersuchung deutlich weniger Probanden auf die Stimulation mit dem Salmonellen-H-Antigen.

In Übereinstimmung mit dem Vergleich der Daten der Proliferationsassays lassen sich zwei Punkte als Erklärung hierfür finden. Erstens ist das H-Antigen beider Studien nicht identisch. In unserer Studie wurden Antigene der Firma Sifin benutzt, während Sztein *et al.* ein selbst hergestelltes Lysat benutzten.

Zweitens gilt der Salmonellenstamm CVD als stärker immunogen als der Salmonellenstamm *S. typhi* Ty21a (Levine, M.M. *et al.* 2001, Tacket., C.O. *et al.* 1992). Der von uns gemessenen arithmetische Mittelwert von 326 pg/ml (Standardabweichung: 184 pg/ml) IFN- γ paßt gut zu den Ergebnissen von Sztein, M. B. *et al.*, auch wenn in beiden Studie unterschiedliche Mutanten von *S. typhi* und nicht identische Antigene zur Stimulation benutzt wurden (Sztein, M. B. *et al.* 1994).

Zusammenfassend komme ich zu der Beurteilung, daß in unserer Studie eine zellulär getragene Immunreaktion auf den Vektor bei sechs von zwölf Probanden nachgewiesen werden kann (Probanden Nr.: 1, 2, 3, 5, 10, 11 =50%).

Bei Proband Nr. 3 und 5 gelang der Nachweis einer zellulären Immunreaktion gegen den Vektor im IFN- γ Elisa und im Proliferationsassay, während bei den anderen Probanden dieser Nachweis jeweils nur in einem der Untersuchungsmethoden gelang. In der Verum-Gruppe konnte bei fünf von neun Probanden der Nachweis einer zellulären Immunreaktion auf den Vektor erbracht werden. Zwei dieser Probanden hatten zuvor eine Impfung gegen Typhus (in Form von Typhoral®) erhalten.

Im Vergleich zur Literatur ergaben sich Hinweise auf eine relativ schwache Stimulation der zellulär getragenen Immunantwort in unserer Untersuchung.

Um die zellulär getragene Immunantwort zu verstärken, gibt es zwei Möglichkeiten. Die oben bereits erwähnte Alternative der Dosissteigerung oder die Verwendung eines immunogeneren Vektors.

3.3. Humorale Immunantwort gegen das Antigen Urease von *Helicobacter pylori*

Im B-Zell-Elispot konnten weder an Tag 7 noch an Tag 14 der Studie spezifische Plasmazellen gegen *H. pylori* Urease festgestellt werden.

Aus diesem Grund liegt der Schluß nahe, daß bei keinem der Probanden eine humorale Immunreaktion gegen das eingeschleuste Fremdartigen Urease von *H. pylori* stattgefunden hat.

Ein Versagen der Testmethode kann ausgeschlossen werden, da die Kontrollen des Elispots (Positiv- und Negativkontrollen) an allen Tagen der Untersuchung

reproduzierbare und verlässliche Ergebnisse lieferten und spezifische spots bei der Untersuchung der humoralen Immunantwort gegen Antigen des Vektors nachgewiesen werden konnten (s.o).

Daß sich der B-Zell-Elispot eignet, um eine Immunreaktion gegen Urease als eingeschleustes Fremdanigen zu detektieren, konnten Michetti *et al.* demonstrieren. Michetti *et al.* untersuchten die Immunantwort an 26 mit *H. pylori* nachweislich infizierten Probanden nach Impfung mit „Heat-labile Enterotoxin“ (LT) von *Escherichia coli* plus aufgereinigter rekombinanter Urease. Es ließ sich ein spezifischer Anstieg der IgA-ASZ gegen rekombinante Urease bei allen Probanden, die der rekombinanten Urease ausgesetzt waren (n=15), nachweisen (Michetti, P. *et al.* 1999).

Basierend auf der bisherigen Auswertung der Daten bietet sich als plausibelste Erklärung eine ungenügende Stimulation des Immunsystems in unserem Impfversuch an. So könnten die relativ immunogenen Antigene des Vektors (LPS und das O-Antigen von *S. typhi*) zwar noch zu einer Immunreaktion geführt haben, das relativ schwach immunogene Molekül Urease jedoch nicht. Für diese Hypothese spricht, daß es nicht gelang lebensfähige Bakterienkulturen des Kontrollstammes und des Impfstamms aus dem Stuhl der Probanden anzuzüchten. Dies legt nahe, daß die Bakterien sich nicht in dem Ausmaß, wie erwartet, repliziert haben und damit evtl. nicht genügend Menge an Urease zur Verfügung stand. Dagegen spricht vor allem daß im T-Zell-Elispot und in den Proliferationsassays eine signifikante Immunreaktion auf Urease bei einigen Probanden nachgewiesen werden konnte (s.u.). Man könnte nun spekulieren, daß T-Zellen sensitiver auf Urease reagieren. Eine Trennung der Immunantwort in zellulär und humoral macht aber zumindest für die thymusabhängigen Antigene (Proteine, wie z.B. Urease) wenig Sinn, da es während der Aktivierung zu zahlreichen Interaktionen und gegenseitigen Stimulation zwischen B und T-Zellen kommt. So kann die B-Zelle, nach Bindung des Antigens an ihrer Oberfläche als APZ für die spezifische T-Zelle fungieren. Die T-Helfer-Zelle wiederum sezerniert die spezifischen Zytokine, welche für die Proliferation und Differenzierung von der naiven B-Zelle benötigt werden (Abbas, A. K. *et al.* 1996).

Interessant in diesem Zusammenhang ist noch eine Veröffentlichung von Al-Ramadi *et al.* In einer Studie an Mäusen, denen ein *aroA*⁻ Stamm von *S. typhimurium* verabreicht wurde, konnte gezeigt werden, daß eine Immunsuppression induziert wurde. Diese

Immunsuppression äußerte sich vor allem in der Unfähigkeit der B-Zellen auf heterologe Antigene mit einer Antikörperantwort zu reagieren. Als Vermittler der Immunsuppression wurden Zellen der Makrophagen-Linie identifiziert (Al-Ramadi, B. K. *et al.* 1991).

Inwiefern diese Ergebnisse sich aus dem Mausmodell auf unsere Humanstudie, durchgeführt mit *S. typhi* Ty21a, übertragen lassen, bleibt fraglich. Eine Immunsuppression, induziert durch Salmonella, wäre jedoch eine einleuchtende Erklärung für die Tatsache, daß im B-Zell-Elispot keine Antwort auf das heterologe Antigen Urease von *H. pylori* entdeckt werden konnte.

In der zweiten Untersuchungsmethode zur Eruiierung einer humoralen Immunantwort auf Urease von *H. pylori* - dem IgG Elisa - konnte ebenfalls kein Nachweis einer Erhöhung spezifischer Antikörper erbracht werden.

Zum einen erscheint dies plausibel, nachdem im B-Zell-Elispot auch keine spezifischen Plasmazellen entdeckt werden konnten, zum anderen ist wie bereits oben beschrieben eine Trennung des Immunsystems in mucosales und systemisches Kompartiment schon von mehreren Autoren beobachtet worden. Das Fehlen eines Nachweises im systemischen Kompartiment - z.B. im Serum - bedeutet damit nicht, daß im mucosalen Kompartiment keine Immunantwort stattfindet.

Zusätzlich sollen an dieser Stelle zwei Studien angeführt werden, die sich mit der Bedeutung der humoralen Immunantwort in Bezug auf die Eradikation von *H. pylori* beschäftigen. Beide Studien basieren auf Ergebnissen aus dem Mausmodell.

In der ersten Studie von Thomas H. Ermak *et al.* (Ermak, T. H. *et al.* 1998) wurde normalen und sog. „knock-out“ Mäusen der *H. pylori* Stamm X47-2AI nach Impfung mit Urease und einem Adjuvans verabreicht. Danach wurde die Anzahl der *H. pylori* Bakterien im Magen und die Leukozyteninfiltration gemessen. Im Vergleich zu den normalen Mäusen ergab sich bei den „knock-out“ Mäusen ohne B-Zellen, also ohne die Fähigkeit zu einer humoralen Immunantwort, dieselbe Protektion durch den Impfstoff. Dies legt nahe, daß eine Protektion gegenüber *H. pylori*, zumindest in der Maus, nicht von der Produktion spezifischer Antikörper abhängt.

Die zweite Studie von Thomas G. Blanchard *et al.* (Blanchard, T. G. *et al.* 1999) kommt zu demselben Ergebnis. Hier wurde den Mäusen ein Lysat aus *H. felis* plus Cholera

Toxin als Impfstoff oral verabreicht und danach die Protektion gegenüber einer Infektion mit *H. felis* beurteilt. Auch hier hatten die Mäuse ohne Fähigkeit zur Produktion von Antikörpern dasselbe Ausmaß einer Protektion wie normale Mäuse.

Ein Vergleich mit anderen Humanstudien an dieser Stelle ist nur schwer möglich, da es insgesamt nur zwei Studien gibt, die Urease als Fremdartigen und Salmonella als Vektor benutzen. In der ersten Studie von DiPetrillo *et al.* konnte in keiner der Untersuchungen eine Immunantwort auf rekombinante Urease festgestellt werden (DiPetrillo, M. D. *et al.* 2000).

In der darauf folgenden Studie von Angelakopoulos *et al.* basieren die Ergebnisse hauptsächlich auf einem modifizierten B-Zell-Elispot, der sich nicht mit den von uns unternommenen Untersuchungen vergleichen läßt. Die einzig vergleichbare Untersuchung in der Studie von Angelakopoulos *et al.* ist der IgG Elisa. Untersucht wurde die Menge an gebildetem IgG gegen rekombinante Urease. Bei einem von 6 Probanden konnte eine Erhöhung des Antikörpertiters um das Vierfache des Ausgangswertes ermittelt werden. Allerdings konnte dieses Ergebnis im Western Blot nicht bestätigt werden (Angelakopoulos, H. *et al.* 2000).

In der Literatur sind weitere Studien beschrieben, die zwar als Vektor Salmonella verwenden als Fremdartigen aber andere Proteine als Urease von *H. pylori*. So wurden attenuierte Salmonellenstämme bereits dazu benutzt eine Immunreaktion gegen Fremdartigen wie das O-Antigen von *Shigella sonnei* (Black, R. E *et al.* 1987), das O-Antigen von *Vibrio cholera* (Tacket, C. O. *et al.* 1990), das Hepatitis-B-core-Antigen (Tacket, C. O. *et al.* 1997) oder das circumsporozoit Protein von *Plasmodium falciparum* (Gonzalez, C. *et al.* 1994) zu induzieren. Die Induktion einer Immunantwort gegen das Fremdartigen ist dabei generell schwierig (Sirard, J. C. *et al.* 1999). So variiert die Anzahl der Probanden, die eine Antikörperproduktion gegen das Fremdartigen zeigen, zwischen 0% und 43% (Bumann, D. *et al.* 2000).

Der Nachweis einer humoralen Immunreaktion gegen Urease von *H. pylori* konnte also nicht erbracht werden. Dies korreliert mit der generellen Schwierigkeit eine humorale Immunantwort gegen ein eingeschleustes Fremdartigen zu induzieren.

Die Bedeutung der humoralen Immunantwort für die Elimination einer Infektion mit *H. pylori* erscheint –belegt durch Untersuchungen an Mäusen- zweifelhaft.

Ob in folgenden Studien zusätzlich Proben gastrointestinaler Flüssigkeit zum Nachweis spezifischen mucosalen IgAs entnommen werden soll, muß daher v.a. auch im Hinblick auf das zusätzliche Risiko für die Probanden streng abgewogen werden.

3.4. Zelluläre Immunantwort gegen das Antigen Urease von *Helicobacter pylori*

Vor der weiteren Besprechung der Immunantwort auf Urease ist es wichtig darauf hinzuweisen, daß sowohl rekombinante Urease als auch native Urease als Testantigene eingesetzt wurden. Rekombinante Urease wurde von einem genetisch veränderten *E. coli* Stamm (Stamm: BL 21) produziert und besteht nur aus der Untereinheit B. Diese Untereinheit B ist weder enzymatisch aktiv, noch in ihrer Tertiärstruktur mit der Urease von *H. pylori* identisch.

Die native Urease wurde aus Lysaten von *H. pylori* gewonnen. Sie besteht aus beiden Untereinheiten (A und B), ist enzymatisch aktiv, und die Tertiärstruktur ist erhalten.

Das „heatshockprotein“ GroEl und LPS von *Escherichia coli* wurden im Proliferationsassay und im T-Zell-Elispot als zusätzliche negativ Kontrollen mitgetestet, um eine Verunreinigung der Proben auszuschließen und damit eine Immunreaktion auf rekombinante oder native Urease eindeutig zurückführen zu können.

Eine nicht vorhandene Immunreaktion auf das „heatshockprotein“ GroEl und LPS von *Escherichia coli* beweist die Spezifität der nachgewiesenen Reaktion gegenüber rekombinanter und nativer Urease.

Im T-Zell-Elispot gelang der Nachweis einer signifikanten Reaktion bei vier Probanden bei Stimulation mit rekombinanter Urease (Proband-Nr.: 2, 5, 10, 11) und bei drei Probanden bei Stimulation mit nativer Urease (Proband-Nr.: 2, 4, 7).

Auffällig ist hier zuerst, daß nur Proband 2 sowohl auf rekombinante wie auch auf native Urease reagiert hat, während die Probanden-Nr. 5, 10 und 11 nur bei Stimulation mit rekombinanter Urease, die Probanden-Nr. 4 und 7 nur bei Stimulation mit nativer Urease einen signifikanten Nachweis einer Immunreaktion hatten.

Bei den Probanden 4 und 7 könnte man den fehlenden Nachweis einer Immunreaktion auf rekombinante Urease dadurch erklären, daß die rekombinante Urease nur aus der

Untereinheit B besteht und deshalb eine mögliche Reaktion auf Untereinheit A nicht nachgewiesen werden konnte.

Die alleinige Reaktion auf rekombinante Urease bei den Probanden 5 und 10 ist schwieriger zu erklären. Die Ursache in der unterschiedlichen räumlichen Struktur der beiden Ureasen zu suchen macht wenig Sinn, da T-Zellen auf Peptide auf MHC II Komplexe reagieren und diese Peptide linear angeordnet sind (Abbas, A. K. *et al.* 1996). T-Zellen reagieren also nicht auf räumliche Strukturen. Die Proband-Nr. 5 und Nr. 11 liegen mit jeweils 21 spots/Mio.PBMC nur knapp über dem von uns festgelegten Schwellenwert von 20 spots/Mio.PBMC. Proband Nr. 10 ist mit 30 spots/Mio.PBMC deutlich über dem Schwellenwert.

Von einem gesicherten Nachweis einer Immunreaktion kann man auf Basis der Daten des T-Zell-Elispots also nur bei einem Probanden, Proband Nr. 2, ausgehen. Bei den anderen Probanden gelang der Nachweis nur bei rekombinanter oder nativer Urease.

Im Proliferationsassay konnte bei einem Probanden eine signifikante Antwort auf Urease von *H. pylori* nachgewiesen werden. Proband-Nr. 5 reagierte dabei sowohl auf die rekombinante als auch auf die native Form der Urease mit einem Stimulationsindex an Tag 28 von 3 bzw. 6. Die Ergebnisse stimmen mit den Resultaten im T-Zell-Elispot überein, allerdings nur für rekombinante Urease. Bei Stimulation mit nativer Urease, bei der ein Stimulationsindex von 6 im Proliferationsassay ermittelt wurde, konnte bei Proband-Nr. 5 keine Reaktion im T-Zell-Elispot detektiert werden.

Wie oben bereits beschrieben, könnte eine mögliche Ursache dafür die siebenfach längere Inkubationszeit im Proliferationsassay sein.

Untersuchungen der zellulären Immunantwort auf das Fremdartigen Urease, die ebenfalls den Proliferationsassay verwendeten, konnten in der Literatur leider nicht gefunden werden, so daß unsere Ergebnisse nicht in Relation zu Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen gesetzt werden können.

Proband-Nr. 5 war gleichzeitig auch der einzige, der eine nachweisliche Erhöhung der IFN- γ Produktion in den Überständen hatte. Allerdings war auch hier eine IFN- γ Produktion nur bei Stimulation mit rekombinanter Urease nachweisbar.

Bei Stimulation mit nativer Urease konnte keine signifikante Reaktion erkannt werden. Wahrscheinlich war hier, bei einem Stimulationsindex von 3, die Menge an gebildetem IFN- γ zu gering, um im Elisa erfasst zu werden, während ein Stimulationsindex von 6 ausreichte.

Betrachtet man die Ergebnisse der Untersuchungen zur zellulären Immunreaktion gegen Urease zusammenfassend, so ist bei zwei Probanden (Proband-Nr.: 2 und 5) eine klare Immunreaktion auf das Fremdanigen Urease von *H. pylori* nachzuweisen. Damit ist es erstmals durch die Verwendung eines rekombinanten Impfstoffes gelungen, eine zelluläre Reaktion gegen Urease von *H. pylori* hervorzurufen. Bei den Probanden 4, 7, 10 und 11 ist ein immunologischer Nachweis in einem der angewendeten Tests gelungen, da dieser Nachweis aber nicht in zwei oder mehr Tests gelang, würde ich hier nicht von einer sicheren Immunreaktion gegen die Urease von *H. pylori* sprechen. Ein weiterer wichtiger Punkt ist die Tatsache, daß sowohl Proband-Nr. 5 als auch Proband-Nr. 2 vor der Studie Kontakt zu Salmonellen hatten. Beide Probanden hatten sich bereits vor der Studie mit Typhoral® impfen lassen. Bei Proband-Nr. 5 konnte dies anhand des bereits an Tag 0 der Studie erhöhten Antikörper-Titers gegen Salmonellen-O-Antigen und anhand der Ergebnisse des Proliferationsassays gezeigt werden. Eine interessante Fragestellung für weitere Studien wäre also, ob eine Auffrischimpfung eine Immunreaktion gegen ein Fremdanigen verstärkt.

V Zusammenfassung

Die Untersuchung eines rekombinanten Impfstoffes aus *S. typhi* Ty21a als Vektor und Urease von *H. pylori* als Fremdanigen an 12 gesunden Probanden konnte folgendes nachweisen.

Die genetische Modifikation von *S. typhi* Ty21a durch die Einschleusung eines Plasmids hat im Vergleich zum Nebenwirkungsprofil des Vektors weder zu qualitativ noch zu quantitativ veränderten Nebenwirkungen geführt. Eine Erprobung des Impfstoffes in einer Phase zwei Studie wäre damit vertretbar.

Der eingesetzte Impfstoff als Kombination aus Vektor und Fremdanigen war ausreichend immunogen. Sowohl zelluläre und humorale Immunantwort gegen Vektor Antigene als auch eine zelluläre Immunreaktion gegen das Fremdanigen Urease von *H. pylori* ließen sich nachweisen.

Durch die Integration eines Plasmids in das Genom von *Salmonella typhi* wurde die Immunität nicht geschwächt.

Aus dem Vergleich unserer Untersuchungen mit den Angaben in der Literatur ergaben sich Hinweise darauf, daß eine stärkere Immunantwort –eventuell durch eine höhere Impfdosis- erzeugt werden kann. Ob die Immunantwort gegen Vektor und das Fremdanigen durch die Verabreichung einer höheren Impfdosis gesteigert werden kann, wäre also eine interessante Fragestellung für zukünftige Studien.

Durch dieses System aus Vektor und Fremdanigen konnte bei der Untersuchung an 12 gesunden Probanden erstmals eine zelluläre Immunreaktion auf das eingeschleuste Fremdanigen Urease von *H. pylori* nachgewiesen werden. Wie oben detailliert beschrieben, ist die zelluläre Immunantwort für eine Elimination einer *H. pylori* Infektion von tragender Bedeutung. Diese Untersuchung ergab damit Hinweise darauf, daß durch den von uns entwickelten und verwendeten Impfstoff eine Protektion und/oder Elimination einer *H. pylori* Infektion erreicht werden kann.

Beide Probanden mit einer deutlichen zellulären Reaktion gegen Urease von *H. pylori* hatten zuvor eine Impfung mit Typhoral® erhalten. Eine bereits bestehende Immunität gegen den Vektor könnte also die Immunreaktion gegen ein eingeschleustes Fremdanigen verstärken. Eine interessante Fragestellung für zukünftige Studien wäre also auch, ob sich durch eine Booster-Impfung die Immunreaktion gegen Urease von *H. pylori* verstärken läßt.

Diese Untersuchung hat also gezeigt, daß ein Impfstoff aus *S. typhi* Ty21a als Vektor und Urease von *H. pylori* als Fremdanigen eine Alternative zur herkömmlichen *H. pylori*-Therapie darstellen kann. Als nächster Schritt sollte nun die Optimierung des Impfmodus im Sinne der Maximierung der Immunantwort folgen, um danach direkt die Fähigkeit dieses Impfstoffes zur Protektion bzw. Elimination zu erproben.

VI Referenzen

- [1] Abbas, A. K. , A. H. Lichtman, J. S. Pober: Immunologie. Verlag Hans Huber 1996
- [2] Al-Ramadi, K. B., Y. W. Chen, J. L. Meissler Jr., Toby K. Eisenstein: Immunosuppression induced by attenuated Salmonella. Reversal by IL-4. *J Immun* 147 (1991) 1954-1961
- [3] Angelakopoulos, H. and E. L. Hohmann: pilot study of phoP/phoQ-deleted Salmonella enterica Serovar typhimurium expressing Helicobacter pylori Urease in adult volunteers. *Infect Immun* 68 (2000) 2135-2141
- [4] Arvilommi, H.: Elispot for detecting antibody-secreting cells in response to infections and vaccination. *APMIS* 104 (1996) 401-410
- [5] Aspinall, G. O., M. A. Monteir, H. Pang, E. J. Walsh, A. P. Moran: O-Antigen chains in the lipopolysaccharide of Helicobacter pylori NCTC 11 637. *Carbohydr Lett* 1 (1994) 151-156
- [6] Atherton, J. C., R. M. Peek, K. T. Tham, T. L. Cover, M. J. Blaser: Clinical and pathological importance of heterogenicity in vacA, the vacuolating cytotoxin gene of Helicobacter pylori. *Gastroenterology* 112 (1997) 92-9
- [7] Axon, A.T., C. A. O'Morain, K. D. Bardhan, J. P. Crowe, A. D. Beattie, R. P. Thompson, P. M. Smith, F. D. Hollanders, J. H. Baron, D. A. Lynch, M. F. Dixon, D. S. Tompkins, H. Birrell, K. R. Gillon: Randomised double blind controlled study of recurrence of gastric ulcer after treatment for eradication of Helicobacter pylori infection. *BMJ* 314 (1997) 565-8

- [8] Backert, S., E. Ziska, V. Brinkmann, U. Zimny-Arndt, A. Fauconnier, P. R. Jungblut, M. Naumann, T. F. Meyer: Translocation of the *Helicobacter pylori* CagA protein in gastric epithelial cells by a type IV secretion apparatus. *Cell Microbiol* 2 (2000) 155-64
- [9] Bayerdorffer, E., A. Neubauer, B. Rudolph, C. Thiede, N. Lehn, S. Eidt, M. Stolte: Regression of primary gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue type after cure of *Helicobacter pylori* infection. MALT Lymphoma Study Group. *Lancet* 345 (1995) 1591-4
- [10] Belfort, M., G. Maley, J. Pedersen-Lane, F. Maley: Primary structure of the *Escherichia coli* thyA gene and its thymidilate synthase product. *Proceedings of the Natural Academy of Science of the United States of America* 80 (1983) 4914-4918
- [11] Bell, G.D., K. Powell, S. M. Burridge, A. Pallearos, P. H. Jones, P. W. Gant, G. Harrison, J. E. Trowell: Experience with 'triple' anti-*Helicobacter pylori* eradication therapy: side effects and the importance of testing the pre-treatment bacterial isolate for metronidazole resistance. *Aliment Pharmacol Ther* 6 (1992) 427-35
- [12] Bergey's Manual of Systematic Bacteriology; second edition, release 1.0, April 2001; taxonomic outline of the procaryotic genera.
- [13] Black, R. E., M. M. Levine, M. L. Clements, G. Losonsky, D. Herrington, S. Berman, S. B. Formal: Prevention of shigellosis by a *Salmonella typhi*-*Shigella sonnei* bivalent vaccine. *J Infect Dis* 155 (1987) 1260-5.
- [14] Blanchard, T. G., S. J. Czinn, R. W. Redline, N. Sigmund, G. Harriman, John G. Nedrud: Antibody-Independent protective mucosal immunity to gastric

- Helicobacter Infection in mice. *Cell Immun* 191 (1999) 74-80
- [15] Bodhidatta, L., C. W. Hoge, S. Churnratanakul, W. Nirdnoy, P. Sampathanakul, C. Tungtaem, S. Raktham, C. D. Smith, P. Echeverria: Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in a developing country: comparison of two ELISAs and a seroprevalence study. *J Infect Dis* 168 (1993) 1549-1553
- [16] Brown, L. M.: *Helicobacter pylori*: epidemiology and routes of transmission. *Epidemiol Rev* 22 (2000) 283-97
- [17] Bukanov, N. O., D. E. Berg: ordered cosmid library and high resolution physical genetic map of *Helicobacter pylori* strain NCTC 11 638. *Mol Microbiol* 11 (1994) 509-523
- [18] Bumann, D., C. Hueck, T. Aebischer, T. F. Meyer: recombinant live *Salmonella* spp. for human vaccination against heterologous pathogens. *FEMS Immunol Med Microbiol* 27 (2000) 357-364
- [19] Clancy R., T. Borody and C. Clancy: What role for clarithromycin in the treatment of *Helicobacter pylori* infection. In *Helicobacter pylori- Basic mechanisms to clinical cure 2000*. Kluwer academic publishers 2000
- [20] Clyne M., B. Drumm: Adherence of *Helicobacter pylori* to the gastric mucosa. *Can J Gastroenterology* 11 (1997) 243-8
- [21] Covacci, A., S. Censini, M. Bugnoli, R. Petracca, D. Burroni, G. Maccia, A. Massone, E. Peppini, Z. Xiang, N. Figuera, R. Rappuoli: Molecular Characterisation of the 128-kDa immunodominant antigen of *Helicobacter pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (1993) 5791-5795

- [22] Cover, T. L. and M. J. Blaser: Purification and characterization of the vacuolating toxin from *Helicobacter pylori*. *J Biol Chem* 267 (1992) 10570-5
- [23] Cover T. L.: The vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol* 20 (1996) 241-6
- [24] Crabtree, J. E., S. M. Farmery, I. J. D. Lindley, N. Figura, P. Peichel, D. S. Tompkins: CagA/cytotoxic strains of *Helicobacter pylori* and interleukin-8 in gastric epithelial cells. *J Clin Pathol* 47 (1994) 945-950
- [25] Crabtree, J. E , A. Covacci, S. M. Farmery, Z. Xiang, D. S. Tompkins, S. Perry, I. J. Lindley, R. Rappuoli: *Helicobacter pylori* induced interleukin-8 expression in gastric epithelial cells is associated with CagA positive phenotype. *J Clin Pathol* 48 (1995) 41-5
- [26] Crabtree, J. E.: Immune an inflammatory response to *Helicobacter pylori* Infection. *Scand J Gastroenterology* 215 (1996) 3-10
- [27] Crowe, S. E., L. Alvarez, M. Dytoc, R. H. Hunt, M. Muller, P. Sherman, J. Patel, Y. Jin, P. B. Ernst: Expression of interleukin 8 and CD54 by human gastric epithelium after *Helicobacter pylori* infection in vitro. *Gastroenterology* 108 (1995) 65-74
- [28] De Boer, W. A.: Strategies for therapy failures: choice of „back up“ regimen determined by primary treatment for *Helicobacter pylori*. In *Helicobacter pylori- Basic mechanisms to clinical cure* 2000. Kluwer academic publishers 2000
- [29] Del Giudice, G., A. Covacci, J. L. Telford, C. Montecucco, R. Rappuoli: The design of vaccines against *Helicobacter pylori* and their development. *Annu Rev Immunol* 19 (2001) 523-63

- [30] DiPetrillo, M. D., T. Tibbetts, H. Kleanthous, K. P. Killeen, E. L. Hohmann: Safety and immunogenicity of phoP/phoQ-deleted *Salmonella typhi* expressing *Helicobacter pylori* urease in adult volunteers. *Vacc* 18 (2000) 449-459
- [31] Dore, M. P., G. Leandro, G. Realdi, A. R. Sepulveda, D. Y. Graham: Effect of pretreatment antibiotic resistance to metronidazole and clarithromycin on outcome of *Helicobacter pylori* therapy: a meta-analytical approach. *Dig Dis Sci* 45 (2000) 68-76
- [32] Drumm, B., G. I. Perez-Perez, M. J. Blaser, P. M. Sherman: Intrafamilial clustering of *Helicobacter pylori* infection. *N Engl J Med* 322 (1990) 359-363
- [33] Dundon, W. G., M. de Bernard, C. Montecucco: Virulence factors of *Helicobacter pylori*. *Int J Med Microbiol* 290 (2001) 647-58
- [34] Dunn, B. E., G. P. Campell, G. I. Perez-Perez, M. J. Blaser: Purification and characterization of urease of *Helicobacter pylori*. *J Biol Chem* 265 (1990) 9464-9469
- [35] Eck, M., B. Schmausser, R. Haas, A. Greiner, S. Czub, H. K. Muller-Hermelink: MALT-type lymphoma of the stomach is associated with *Helicobacter pylori* strains expressing the CagA protein. *Gastroenterology* 112 (1997) 1482-6
- [36] Engels, E. A., M. E. Falagas, J. Lau, M. L. Benish: Typhoid fever vaccines: a meta-analysis of studies on efficacy and toxicity. *British medical J* 316 (1998) 110-116
- [37] Ermak, T. H., P. J. Giannasca, R. Nichols, G. A. Myers, J. Nedrud, R. Weltzin, C. K. Lee, H. Kleanthous, Thomas P. Monath: Immunization of Mice with Urease vaccine affords protection against *Helicobacter pylori* Infection in the absence of antibodies and is mediated by MHC Class II- restricted response. *J*

- Exp Med 188 (1998) 2277-2288
- [38] Ferrero, R. L., J. M. Thiberge, I. Kansau, N. Wuscher, M. Huerre, A. Labigne: The GroES homolog of *Helicobacter pylori* confers protective immunity against infection in mice. Proc Natl Acad Sci USA 92 (1995) 6499-6503
- [39] Fields, P. I., R. V. Swanson, C. G. Haidaris, F. Heffron: Mutants of *Salmonella typhimurium* that cannot survive within macrophages are avirulent. Proc Natl Acad Sci USA 83 (1986) 5189-5193
- [40] Figura, N., J. E. Crabtree: *Helicobacter pylori* vacuolating toxin. In Hunt, R. H., G. N. J. Tytgat (eds.): *Helicobacter pylori*, basic mechanisms to clinical cure. Kluwer Academic Publishers 1994 (222-231)
- [41] Finlay, B. B., S. Falkow: *Salmonella* as an intracellular parasite. Mol Microbiol 3 (1989) 1833-1841
- [42] Genta, R. M.: The immunobiology of *Helicobacter pylori* gastritis. Semin Gastrointest Dis 8 (1997) 2-11
- [43] Germanier, R., E. Furer: Characteristics of the attenuated oral vaccine strain "S. typhi" Ty 21a. Dev Biol Stand 53 (1983) 3-7
- [44] Gilman, R. H., R. Hornick, W. Woodard, H. Dupont, M. Snyder, M. M. Levine, J. P. Libonati: Evaluation of UDP-glucose-4-epimerase-less mutant of *Salmonella typhi* as a live oral vaccine. J Inf Dis 136 (1977) 717-723
- [45] Gomez-Duarte, O. G., B. Lucas, Z. X. Yan, K. Panthel, R. Haas, T. F. Meyer: Protection of mice against gastric colonization by *Helicobacter pylori* by single oral dose immunization with attenuated *Salmonella typhimurium* producing urease subunits A and B. Vac 17 (1998) 460-471

- [46] Gonzalez, C., D. Hone, F. R. Noriega, C. O. Tacket, J. R. Davis, G. Losonsky, J. P. Nataro, S. Hoffman, A. Malik, E. Nardin, et al.: Salmonella typhi vaccine strain CVD 908 expressing the circumsporozoite protein of Plasmodium falciparum: strain construction and safety and immunogenicity in humans. *J Infect Dis* 169 (1994) 927-31
- [47] Goodman, K. J., M. Cockburn: The role of epidemiology in understanding the health effects of Helicobacter pylori. *Epidemiology* 12 (2001) 266-71
- [48] Goodwin, C. S.: How Helicobacter pylori acquired its name and how it overcomes gastric defense mechanism. *J Gastroenterol Hepatol* 9 (1994) S1-S3
- [49] Graham, D. Y.: Antibiotic resistance in Helicobacter pylori: implications for therapy. *Gastroenterology* 115 (1998) 1272-7
- [50] Graham, D. Y., Y. Yamaoka: Disease-specific Helicobacter pylori virulence factors: the unfulfilled promise. *Helicobacter* 5 (2000) 3 -9; discussion S27-31
- [51] Hamilton-Miller, J. M., R. A. Gargan: Rapid screening for urease inhibitors. *Invest Urol* 16 (1979) 327-8
- [52] Harrisons Innere Medizin. Blackwell Wissenschafts Verlag 1995
- [53] Heep, M., M. Kist, S. Strobel, D. Beck, N. Lehn: Secondary resistance among 554 isolates of Helicobacter pylori after failure of therapy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 19 (2000) 538-41
- [54] Herold G.: Innere Medizin. 2000

- [55] Herrington, D. A., D. Van, S. B. Formal, T. L. Hale B. D. Tall, S. J. Cryz, E. C. Tramont, M. M. Levine: Studies in volunteers to evaluate candidate *Shigella* vaccines: further experience with *Salmonella typhi*-*Shigella sonnei* vaccines and protection conferred by previous *Shigella sonnei* disease. *Vacc* 8 (1990) 353-357
- [56] Hone, D., S. Attridge, L. Van den Bosch, J. Hackett: A chromosomal integration system for stabilization of heterologous genes in *Salmonella* based vaccine strains: *Microbiol Path* 5 (1988) 407-418
- [57] Hone, D. M., C. O. Tacket, A. M. Harris, B. Kay, G. Losonsky, M. M. Levine: Evaluation in volunteers of a candidate live oral attenuated *Salmonella typhi* vector vaccine. *J Clin Invest* 90 (1992) 412-420
- [58] Houben, M.H., D. Van Der Beek, E. F. Hensen, A. J. Craen, E. A. Rauws, G. N. Tytgat: systematic review of *Helicobacter pylori* eradication therapy -the impact of antimicrobial resistance on eradication rates. *Aliment Pharmacol Ther* 13 (1999) 1047-55
- [59] Hu, L. T. and H. L. Mobley: Purification and N-terminal analysis of urease of *Helicobacter pylori*. *Infect Immun* 58 (1990) 9-998
- [60] Hessel, T., P. G. Isaacson, J. E. Crabtree, J. Spencer: The response of cells from low-grade B-cell gastric lymphomas of mucosa associated lymphoid tissue to *Helicobacter pylori*. *Lancet* 342 (1993) 571-574
- [61] Iezzi, G., K. Karjalainen, A. Lanzavecchia: The duration of antigenic stimulation determines the fate of naive and effector T cells. *Immunity* 8 (1998) 89-95
- [62] International Agency for Research on Cancer. Vol. 661 (1994) p. 177

- [63] Ivanoff, B., M. M. Levine, P. H. Lambert: Vaccination against typhoid fever: present status. *Bulletin of the World Health Organization* 72 (1994) 957-971
- [64] Kagaya, K., K. Watanabe, Y. Fukazawa: Capacity of recombinant gamma interferon to activate macrophages for *Salmonella* killing activity. *Infect Immun* 57 (1989) 609-615
- [65] Kantele, A., H. Arvilommi, I. Jokinen: Spezific immunoglobulin secreting human blood cells after peroral vaccination against *Salmonella typhi*. *J Inf Dis* 153 (1986) 1126-1131
- [66] Kantele, A.: Antibody-secreting cells in the elvaluation of immunogenicity of an oral vaccine. *Vacc* 8 (1990) 321-326
- [67] Kantele, A., J. M. Kantele, E. Savilahti, M. Westerholm, H. Arvilommi, A. Lazarovits, E. C. Butcher, P. H. Makela: Homing potentials of circulating lymphocytes in humans depend on the site of activation: oral, but not parenteral, typhoid vaccination induces circulating antibody-secreting cells that all bear homing receptors directing them to the gut. *J Immunol* 158 (1997) 574-9
- [68] Karttunen R., T. Karttunen, H. Ekre, T. T. MacDonald: Interferon gamma and Interleukin 4 secreting cells in the gastric antrum in *Helicobacter pylori* positiv and negativ gastritis. *Gut* 36 (1995) 341-345
- [69] Kayser F. H., K. A. Bienz, J. Eckert, R. M. Zinkernagel: Medizinische Mikrobiologie. Thieme 1998
- [70] Kelso, A.: Th1 an d Th2 subsets – paradigms loss. *Immunol Today* 16 (1995) 374-379

- [71] Kist, M.: Epidemiology and diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Z Gastroenterol Verh* 26 (1991) 286-9
- [72] Krakowka S., D. R. Morgan, W. G. Kraft, R. D. Leunk: Establishment of gastric *Campylobacter pylori* infection in the neonatal gnotobiotic piglet. *Infect Immun* 55 (1987) 2789
- [73] Kreiss, C., T. Buclin, M. Cosma, I. Cortesi-Theulaz, P. Michetti: Safety of oral immunisation with rekombinant urease in patients with *Helicobacter pylori* infection. *Lancet* 347 (1996) 1630-1631
- [74] Kurose, I., D. N. Granger, D. J. Evans Jr, D. G. Evans, D. Y. Graham, M. Miyasaka, D. C. Anderson, R. E. Wolf, G. Cepinskas, P. R. Kvietys: *Helicobacter pylori*-induced microvascular protein leakage in rats: role of neutrophils, mast cells, and platelets. *Gastroenterology* 107 (1994) 70-9
- [75] Labigne, S. R., V. Cussac, P. Courcoux: Shuttle cloning and nucleotide sequences of *Helicobacter pylori* genes responsible for urease activity. *J Bacteriol* 173 (1991) 1920-1931
- [76] Levine, M. M., D. Hone, C. Tacket, C. Ferreccio, S. Cryz: Clinical and field trials with attenuated *Salmonella typhi* as live oral vaccines and as „carrier“ vaccines. *Res In Microbiol* 141 (1990) 807-816
- [77] Levine, M. M., C. O. Tacket, M. B. Sztein: Host-*Salmonella* interaction: human trials. *Microbes and Infection* 3 (2001) 1271-1279
- [78] Lind, T., S. Veldhuyzen van Zanten, P. Unge, R. Spiller, E. Bayerdorffer, C. O'Morain, K. D. Bardhan, M. Bradette, N. Chiba, M. Wrangstadh, C. Cederberg, J. P. Idstrom: Eradication of *Helicobacter pylori* using one-week triple therapies

- combining omeprazole with two antimicrobials: the MACH I Study. *Helicobacter* 1 (1996) 138-44
- [79] Logan, R. P.: *Helicobacter pylori* and gastric cancer. *Lancet* 344 (1994) 1078-1079.
- [80] Macchia, G., A. Massone, D. Burroni, A. Covacci, S. Censini, R. Rappuoli: The hsp60 protein of *Helicobacter pylori*: structure and immune response in patients with gastroduodenal disease. *Mol Microbiol* 9 (1993) 645-652
- [81] Mai, U. E. H., G. I. Perez-Perez, L. M. Wahl, S. M. Wahl, M. J. Blaser, P. D. Smith: Soluble surface proteins from *Helicobacter pylori* activate monocyte/macrophages by lipopolysaccharide-independent mechanisms. *J Clin Invest* 87 (1991) 894-900
- [82] Malferheiner, P.: *Helicobacter pylori- Von der Grundlage zur Therapie*. Georg Thieme Verlag 2000
- [83] Marais, A., G. L. Mendz, S. L. Hazell, F. Megraud: Metabolism and genetics of *Helicobacter pylori*: the genome era. *Microbiol Mol Biol Rev* 63 (1999) 642-74
- [84] Marchetti, M., B. Arico, D. Burroni, N. Figura, R. Rappuoli, P. Ghiara: Development of a mouse model of *Helicobacter pylori* infection that mimics human disease. *Science* 267 (1995) 1655-1658
- [85] Marshall B. J., J. R. Warren: Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* 16 (1984) 1311-5
- [86] McCarthy, C., S. Patchett, R. M. Collins, S. Beattie, C. Kreane, C. O'Morain: Long-Term prospective study of *Helicobacter pylori* in nonulcer-dyspepsia. *Dig Dis Sci* 40 (1995) 114-119

- [87] Megraud, F.: Transmission of *Helicobacter pylori*: faecal-oral versus oral-oral route. *Aliment Pharmacol Ther* 9 (1995) Suppl 2:85-91
- [88] Megraud, F., H. P. Doermann: Clinical relevance of resistant strains of *Helicobacter pylori*: a review of current data. *Gut* 43 (1998) 61-5
- [89] Michetti, P., I. Cortesi-Theulaz, C. Davin, R. Haas, A. C. Vaney, M. Heitz, J. Bille, J. P. Kraehenbuhl, E. Sagara, A. L. Blum: Immunization of BALB/c mice against *Helicobacter felis* infection with *Helicobacter pylori* Urease. *Gastroenterology* 107 (1994) 1002-1011
- [90] Michetti, P., C. Kreiss, K. L. Kotloff, N. Porta, J.-L. Blanco, D. Bachmann, M. Ranz, P. F. Idinger, I. Orthési-Theulaz, G. Sonsky, R. Chols, J. Imon, M. Tolte, S. Ackerman, T. P. Monath, A. I. Blum: Oral immunization with urease and *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin is safe and immunogenic in *Helicobacter pylori*-infected adults. *Gastroenterology* 116 (1999) 804-12
- [91] Miyashita, M., T. Joh, K. Watanabe, I. Todoroki, K. Seno, H. Ohara, T. Nomura, M. Miyata, K. Kasugai, K. Tochikubo, M. Itoh, M. Nitta: Immune responses in mice to intranasal and intracutaneous administration of a DNA vaccine encoding *Helicobacter pylori*-catalase. *Vaccine* 22 (2002) 2336-42
- [92] Mobley, H. L. T., M. D. Island, R. P. Hausinger: Molecular biology of microbial ureases. *Microbiol Rev* 59 (1995) 451-480
- [93] Mohammadi, M., S. Czinn, R. Redline, J. Nedrud: *Helicobacter* specific cell-mediated immune response display a predominant Th1 phenotype and promote a delayed-type hypersensitivity response in the stomach of mice. *J Immunol* 156 (1996) 4729-4738

- [94] Mohammadi, M., J. Nedrud, R. Redline, N. Lycke, S. J. Czinn: Murine CD4 T-cell response to *Helicobacter* infection: TH1 cells enhance gastritis and TH2 cells reduce bacterial load. *Gastroenterology* 113 (1997) 1848-57
- [95] Morona, R., J. Yeadon, A. Considine, J. K. Morona, P. A. Manning: Construction of a plasmid vector with non-antibiotic selection system based on the *Escherichia coli* thyA+gene: application to cholera vaccine development. *Gene* 107 (1991) 139-144
- [96] Morris, A., G. Nicholson: Ingestion of *Campylobacter pyloridis* and causes gastritis and raised fasting gastric pH. *Amer J Gastroenterol* 82 (1987) 192-199
- [97] Mutoliala, A., H. P. Makela: the role of INF-gamma in murine *Salmonella typhimurium* infection. *Microb Pathogen* 8 (1990) 135-141
- [98] Nakayama K., S. M. Kelly, R. Curtiss: Construction of an Asd+ expression-cloning vector: stable maintenance and high level expression of cloned genes in a *Salmonella* vaccine strain. *Biotechnology* 6 (1988) 693-697
- [99] National Institutes of Health Guidelines: The report of the digestive Health Initiative SM International update Conference on *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 113 (1997) 4-8
- [100] Odenbreit, S., J. Puls, B. Sedlmaier, E. Gerland, W. Fischer, R. Haas: Translocation of *Helicobacter pylori* CagA into gastric epithelial cells by type IV secretion. *Science* 25 (2000) 1497-500
- [101] Owen, R. J.: *Helicobacter* species classification and identification. *Br Med Bull* 54 (1998) 17-30
- [102] Parsonett, J., G. D. Friedman, D. P. Y. Vandersteen, J. H. Vogelmann, N.

- Orentreich, R. K. Sibley: *Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric carcinoma. *N Engl J Med* 325 (1991) 1127-1131
- [103] Parsonnet, J., G. D. Friedman, N. Orentreich, J. H. Vogelmann: Risk for gastric cancer in people with CagA positive or CagA negative *Helicobacter pylori* infection. *Gut* 40 (1997) 297-301
- [104] Pounder, R. E. and D. Ng: The prevalence of *Helicobacter pylori* infection in different countries. *Aliment Pharmacol Ther* 9 (1995) 33-39
- [105] Radcliff, F., A. J. Ramsey, A. Lee: Failure of immunisation against *Helicobacter* infection in IL-4 mice: evidence of the TH2 immune response as the basis for protective immunity. *Gastroenterology* 110 (1996) A997
- [106] Radcliff F., A. J. Ramsey, A. Lee: A mixed Th1/Th2 response may be necessary for effective immunity against *Helicobacter*. *Immunol Cell Biol* 75 (1997) A90
- [107] Radcliff, F. J., S. L. Hazell, T. Kolesnikow, C. Doidge, A. Lee: Catalase, a novel antigen for *Helicobacter pylori* vaccination. *Infect Immun* 65 (1997) 4668-74
- [108] Rathbone, B. J., J. I. Wyatt, B. W. Worsley, S. E. Shires, L. K. Trejdosiewicz, R. V Heatley, M. S. Losowsky: Systemic and local Antibody response to gastric *Campylobacter pyloridis* in non-ulcer dyspepsia. *Gut* 27 (1986) 642-647
- [109] Riede, U.N., H.N. Schäfer et al.: *Allgemeine und spezielle Pathologie*. Georg Thieme Verlag 1995
- [110] Rupnow, M. F., D. K. Owens, R. Shachter, J. Parsonnet: *Helicobacter pylori* vaccine development and use: a cost-effectiveness analysis using the Institute of Medicine Methodology. *Helicobacter* 4 (1999) 272-80

- [111] Schraw W., M. S. McClain, T. L. Cover: Kinetics and mechanisms of extracellular protein release by *Helicobacter pylori*. *Inf Imm* 67 (1999) 5247-52
- [112] Schreiber, S., M. Stuben, C. Josenhans, P. Scheid, S. Suerbaum: In vivo distribution of *Helicobacter felis* in the gastric mucus of the mouse: experimental method and results. *Infect Immun* 67 (1999) 5151-6
- [113] Scott, P., G. Trinchieri: The role of natural killer cells in host-parasite interactions. *Curr Opin Immunol* 7 (1995) 34-40
- [114] Segal, E. D., J. Shon, L. S. Tompkins: Characterization of *Helicobacter pylori* urease mutants. *Infect Immuno* 60 (1992) 1883-1889
- [115] Shimizu, T., T. Akamatsu, A. Sugiyama, H. Ota, T. Katsuyama: *Helicobacter pylori* and the surface mucous gel layer of the human stomach. *Helicobacter* 1 (1996) 207-18
- [116] Shimoyama T., J. E. Crabtree: Bacterial factors and immune pathogenesis in *Helicobacter pylori* infection. *Gut* 43 (1998) S2-5
- [117] Sirard J. C., F. Niedergang, J. P. Kraehenbuhl: Live attenuated *Salmonella*: a paradigm of mucosal vaccines. *Immunol Rev* 171 (1999) 5-26
- [118] Smoot, D. T., H. L. Mobley, G. R. Chippendale, J. F. Lewison, J. H. Resau: *Helicobacter pylori* urease activity is toxic to human gastric epithelial cell. *Infect Immun* 58 (1990) 1992-1994
- [119] Sobala, G. M., J. E. Crabtree, M. F. Dixon, C. J. Schorah, J. D. Taylor, B. J. Rathbone, R. V. Heatley, A. T. Axon: Acute *Helicobacter pylori* infection: clinical

- features, local and systemic immune response, gastric mucosal histology, and gastric juice ascorbic acid concentrations. *Gut* 32 (1991) 1415-8
- [120] Solnick, J. V., C. Josenhans, S. Suerbaum, L. S. Tompkins, A. Labigne: Constrution and Characterization of an isogenic urease- negative mutant of *Helicobacter mustelae*. *Infect Immuno* 63 (1995) 3718-3721
- [121] Stolte, M., S. Eidt: Lymphoid follicles in the antral mucosa: immune response to *Campylobacter pylori*. *J Clin Pathol* 42 (1989) 1269-1271
- [122] Strieter, R. M., K. Kasahara, R. M. Allen, T. J. Standiford, M. W. Rolfe, F. S. Becker, S. W. Chensue, S. L. Kunkel: Cytokine-induced neutrophil-derived interleukin-8. *Am J Pathol* 141 (1992) 397-407
- [123] Suerbaum, S.: Genetic variability within *Helicobacter pylori*. *Int J Med Microbiol* 290 (2000) 175-81
- [124] Sztein, M. B., S. S. Wassermann, C. O. Tacket, R. Edelman, D. Hone, A. A. Lindberg, M. M. Levine: Cytokine production patterns and lymphoproliferative response in volunteers orally immunized with attenuated vaccine strains of *Salmonella typhi*. *J Inf Dis* 170 (1994) 1508-1517
- [125] Tacket, C. O., B. Forrest, R. Morona, S. R. Attridge, J. LaBrooy, B. D. Tall, M. Reymann, D. Rowley, Myron M. Levine: Safty, Immunogenicity, and Efficacy against Cholera Challenge in Humans of a Typhoid-Cholera Hybrid Vaccine derived from *Salmonella typhi* Ty21a. *Inf A Immun* 58 (1990) 1620-1627
- [126] Tacket, C. O., D. M. Hone, G. A. Losonsky, L. Guers, R. Edelman, M. M. Levine: Clinical acceptability and immunogenicity of CVD 908 *Salmonella typhi* vaccine strain. *Vaccine* 10 (1992) 443-446

- [127] Tacket, C. O., S. M. Kelly, F. Schodel, G. Losonsky, J. P. Nataro, R. Edelman, M. M. Levine, R. Curtiss: Safty and Immunogenicity in humans of an attenuated *Salmonella typhi* vaccine vector strain expressing plasmid-encoded hepatitis B antigens stabilized by the Asd-balanced lethal vector system. *Infect Immun* 65 (1997) 3381-3385
- [128] Takeuchi, A.: Electron microscopic studies of experimental *Salmonella* infection. 1. Penetration into the intestinal epithelium by *Salmonella typhimurium*. *Am J Pathol* 50 (1966) 109-136
- [129] Tarkkanen, J., T. U. Kosunen, E. Skalsla: Contact of Lymphocytes with *Helicobacter pylori* augments natural killer cells activity and induces production of gamma interferon. *Infect Immun* 61 (1993) 3012-3016
- [130] Tham, K. T., R. M. Peek, J. C. Atherton, T. L. Cover, G. I. Perez-Perez, Y. Shyr, M. J. Blaser: *Helicobacter pylori* genotypes, host factors, and gastric mucosal histopathology in peptic ulcer disease. *Hum Pathol* 32 (2001) 264-73
- [131] The Eurogast Study Group: Epidemiology of and risk factors for *Helicobacter pylori* infection among 3194 asymptomatic subjects in 17 populations. *Gut* 34 (1993) 1672-1676
- [132] The European *Helicobacter* Study Group. Current concepts in the Management of *Helicobacter pylori* Infection. The Maastrich 2-2000 Consensus Report, 21-2 September 2000
- [133] Tramont, E. C., R. Chung, S. Berman, D. Keren, C. Kapfer, S. B. Formal: Safty and Antigenicity of Typhoid-Shigella sonnei Vaccine (Strain 5076-1C). *J Inf Dis* 149 (1984) 133-136
- [134] Tufano, M. A., F. Rossano, P. Catalanotti, G. Liguori, C. Capasso, M. T.

- Ceccarelli, P. Marinelli: Immunobiological activities of *Helicobacter pylori* porins. *Infect Immun* 62 (1994) 1392-9
- [135] Tummuru, M. K., T. L. Cover, M. J. Blaser: Cloning and Expression of a high-molecular-mass major antigen of *Helicobacter pylori*; evidence of linkage to cytotoxin production. *Infect Immun* 61 (1993) 1799-1809
- [136] Tumorzentrum Berlin: maligne lymphatische Systemerkrankungen. Empfehlung zu Diagnostik und Therapie. 1 Auflage 1998
- [137] Vaira, D., M. Menegatti, M. Miglioli: What is the role of *Helicobacter pylori* in complicated ulcer disease? *Gastroenterology* 113 (1997) 78-84
- [138] Valnes, K., P. Brandtzaeg: Subclass distribution of mucosal Ig-G producing cells in gastritis. *Gut* 30 (1989) 322-326
- [139] Vanet, A., A. Labigne: Evidence of specific secretion rather than autolysis in the release of some *Helicobacter pylori* proteins. *Infect Immun* 66 (1998) 1023-27
- [140] Verma, R.: Immunity to *Salmonella*. *Reviews in medical Microbiology* 10 (1999) 79-87
- [141] Viret, J. F., D. Favre, B. Wegmuller, C. Herzog, J. U. Que, S. J. Cryz Jr, A. B. Lang: Mucosal and systemic immune responses in humans after primary and booster immunizations with orally administered invasive and noninvasive live attenuated bacteria. *Infect Immun* 67 (1999) 3680-5
- [142] Von Wulffen, H., H. J. Grote, S. Gaterman, T. Loning, B. Berger, C. Buhl: Immunoblot analysis of immune response to *Campylobacter pylori* and its clinical associations. *J Clin Pathol* 41 (1988) 653-659

- [143] Wang, G., M. Z. Humayun, D. E. Taylor: Mutation as an origin of genetic variability in *Helicobacter pylori*. *Trends Microbiol* 7 (1999) 488-93
- [144] Warren, J. R., B. Marshall: Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. (Letter). *Lancet* 1 (1983) 1273-5
- [145] Williams, C. L., T. Preston, M. Hossack, C. Slater, K. L. E. McColl: *Helicobacter pylori* utilizes urea for amino acid synthesis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 13 (1996) 87-94
- [146] Wyant, T. L., M. K. Tanner, Marcelo B. Sztein: Potent immunoregulatory effects of *Salmonella typhi* flagella on antigenetic stimulation of human peripheral blood mononuclear cells. *Infect Immun* 67 (1999) 1338-1346
- [147] Xiang, Z., S. Censini, P. F. Bayeli, J. L. Telford, N. Figura, R. Rappuoli, A. Covacci: Analysis of expression of CagA and VacA virulence factors in 43 strains of *Helicobacter pylori* reveals that clinical isolates can be divided into two major types and that CagA is not necessary for expression of the vacuolating cytotoxin. *Infect Immun* 63 (1995) 94-8
- [148] Yamaoka, Y., T. Kodama, O. Gutierrez, J. G. Kim, K. Kashima, D. Y. Graham: Relationship between *Helicobacter pylori* *iceA*, *cagA* and *vacA* status and clinical outcome: studies in four different countries. *J Clin Microbiol* 37 (1999) 2274-9
- [149] Yoshida, N., D. N. Granger, D. J. Evans Jr, D. G. Evans, D. Y. Graham, D. C. Anderson, R. E. Wolf, P. R. Kvietys: Mechanisms involved in *Helicobacter pylori*-induced inflammation. *Gastroenterology* 105 (1993) 1431-40

VII Danksagung

Für Rat und Tat danke ich:

Meinem Betreuer Dr. Wolfram Metzger sowie Frau Susanne Diescher, Frauke Kühl, Anilie Dernier, Tasso Tsirpouchtsidis, Karl Ebermayer, Galip Karaali, Dr. Roznowski, Dr. Dirk Bumann, Dr. Gabi Haas, Dr. T. Aebischer, Dr. Mansouri und Dr. Höcker.

Prof. Wiedenmann danke ich für die Betreuung als Doktorvater.

Prof. Meyer danke ich für die Möglichkeit diese Dissertation in seiner Abteilung für Molekulare Biologie am Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie anfertigen zu können.

Für die persönliche Unterstützung gilt mein Dank vor allem Anja Braun und Fabian Hainzl.

Ein besonderer Dank gilt den 12 Probanden und Probandinnen.

VIII Anhang

Alle signifikanten Ergebnisse der Tabellen 1-5 sind „**fett**“ markiert

Tabelle 1: B-Zell-Elispot

Spots/Mio. PBMZ bei Stimulation mit dem O-Antigen und LPS von *Salmonella typhi*, nativer und rekombinanter Urease von *Helicobacter pylori* an Tag 0/ Tag 7/ Tag 14 der Studie:

Proband:	LPS			O-Antigen		
1	0	352	1	3	9	1
6	9	28	0	4	29	1
9	1	8	1	1	4	2
2	1	60	1	3	76	4
3	1	288	1	2	387	1
4	1	21	1	0	63	1
5	1	8	1	2	8	1
7	1	16	0	3	17	0
8	1	26	0	2	59	1
10	0	45	2	2	49	8
11	0	146	1	1	205	4
12	1	15	1	2	29	2

Proband:	native Urease			rek. Urease		
1	1	2	1	0	5	1
6	5	8	0	3	6	1
9	0	7	0	1	8	1
2	1	3	2	0	4	1
3	1	3	1	1	2	1
4	0	3	0	1	6	1
5	0	7	0	1	9	1
7	2	2	1	3	7	3
8	3	5	0	7	2	0
10	3	2	0	2	2	0
11	0	2	1	0	5	1
12	1	2	0	0	4	3

Tabelle 2: Elisa

Antikörperproduktion gegen das O-Antigen und LPS von *Salmonella typhi*, native und rekombinante Urease von *Helicobacter pylori* an Tag 0/ Tag 7/ Tag 14/ Tag 28 der Studie:

Proband:	LPS				O-Antigen			
1	0,06	0,06	0,07	0,07	0,13	0,10	0,12	0,08
6	0,07	0,10	0,08	0,08	0,10	0,14	0,12	0,11
9	0,06	0,06	0,11	0,13	0,18	0,22	0,24	0,26
2	0,06	0,09	0,11	0,11	0,12	0,15	0,18	0,17
3	0,10	0,48	0,71	0,69	0,11	0,22	0,45	0,42
4	0,05	0,05	0,04	0,05	0,11	0,09	0,14	0,16
5	0,22	0,29	0,27	0,30	0,31	0,36	0,36	0,33
7	0,05	0,05	0,05	0,05	0,10	0,09	0,10	0,12
8	0,05	0,15	0,21	0,14	0,23	0,24	0,26	0,19
10	0,06	0,09	0,13	0,11	0,12	0,13	0,21	0,19
11	0,16	0,39	0,81	0,79	0,15	0,31	0,62	0,60
12	0,05	0,05	0,06	0,06	0,08	0,11	0,14	0,14

Proband:	native Urease				rek. Urease			
1	0,14	0,06	0,06	0,06	0,53	0,06	0,07	0,06
6	0,08	0,08	0,07	0,08	0,09	0,09	0,08	0,08
9	0,05	0,05	0,05	0,11	0,07	0,07	0,07	0,07
2	0,05	0,10	0,05	0,07	0,05	0,04	0,04	0,04
3	0,06	0,07	0,06	0,14	0,07	0,06	0,06	0,06
4	0,06	0,06	0,06	0,06	0,08	0,07	0,08	0,07
5	0,08	0,07	0,06	0,06	0,07	0,07	0,06	0,06
7	0,08	0,08	0,08	0,09	0,07	0,08	0,07	0,08
8	0,07	0,06	0,07	0,06	0,09	0,09	0,08	0,07
10	0,05	0,05	0,05	0,07	0,06	0,06	0,06	0,06
11	0,05	0,05	0,05	0,06	0,05	0,05	0,05	0,05
12	0,06	0,05	0,05	0,05	0,06	0,06	0,06	0,07

Tabelle 3: IFN- γ Elisa (T-Zell-Elispot)

Spots/Mio. PBMZ bei Stimulation mit dem H-Antigen von *Salmonella typhi*, nativer und rekombinanter Urease von *Helicobacter pylori* an Tag 0/ Tag7/ Tag 28 der Studie:

Proband:	H-Antigen			nat. Urease			rek. Urease		
1	5	10	16	6	19	19	6	18	18
6	5	3	13	4	1	14	2	2	13
9	2	4	15	2	3	18	4	4	14
2	3	36	19	2	91	45	8	32	21
3	17	4	12	7	4	10	12	3	16
4	9	4	11	3	7	24	5	6	13
5	10	1	9	4	3	15	6	2	21
7	8	9	17	1	12	24	3	7	18
8	8	6	8	6	4	3	8	8	4
10	5	5	21	2	7	17	7	6	30
11	5	3	9	3	2	20	5	2	21
12	5	5	11	2	4	16	3	7	9

Tabelle 4: Proliferationsassay

SI bei Stimulation mit dem H-Antigen von *Salmonella typhi*, nativer und rekombinanter Urease von *Helicobacter pylori* an Tag 0/ Tag7/ Tag 28 der Studie:

Proband:	H-Antigen			nat. Urease			rek. Urease		
1	3,7	1,7	3,3	2,6	1,4	2,0	1,4	1,3	1,6
6	1,5	0,9	2,7	1,0	0,9	1,7	1,0	0,9	1,3
9	0,7	2,3	1,3	1,5	1,3	1,8	0,9	1,4	1,3
2	1,2	0,9	1,4	1,1	1,2	1,0	1,7	1,1	1,2
3	1,7	0,7	3,2	1,2	1,8	1,2	1,6	1,1	1,5
4	2	0,5	1,7	0,9	1,4	1,8	2,0	0,9	1,6
5	4,5	2,2	5,6	1,7	2,1	6,5	1,3	1,6	3,4
7	1,6	0,8	2	2,1	0,6	1,4	1,7	0,7	1,5
8	1,6	1,7	2,5	2,5	1,1	1,2	1,0	1,1	1,6
10	2,1	2,1	2,7	1,3	1,5	1,3	0,8	1,6	2,1
11	1,4	0,7	1,5	1,7	0,3	0,8	1,5	0,7	1,2
12	1,2	1,3	1,8	1,7	1,0	2,4	1,4	1,2	1,8

Tabelle 5: IFN- γ Elisa

IFN- γ Produktion ($\mu\text{g/ml}$) bei Stimulation mit dem H-Antigen von *Salmonella typhi*, nativer und rekombinanter Urease von *Helicobacter pylori* an Tag 0/ Tag 7/ Tag 28 der Studie:

Proband:	H-Antigen			nat. Urease			rek. Urease		
1	0,10	0,05	0,04	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
6	0,09	0,00	0,00	0,04	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
9	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,01
2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
3	0,00	0,02	0,41	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
4	0,03	0,00	0,00	0,03	0,00	0,00	0,03	0,00	0,00
5	0,00	0,00	0,46	0,00	0,00	0,58	0,00	0,00	0,00
7	0,00	0,00	0,06	0,00	0,00	0,05	0,00	0,00	0,05
8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
11	0,00	0,00	0,12	0,00	0,00	0,02	0,00	0,00	0,02
12	0,00	0,00	0,07	0,00	0,00	0,07	0,00	0,00	0,07

Alle signifikanten Ergebnisse der Tabellen 1-5 sind „fett“ markiert.

nat. Urease: native Urease

rek. Urease: rekombinante Urease



Abb. 13: Schematische Darstellung des zeitlichen Ablaufs der Studie

Die Untersuchung des **Blutes** beinhaltete:

- die Bestimmung hämatologischer Parameter (Differentialblutbild)
- die Bestimmung klinisch-chemischer Parameter (Kreatinin, S-GOT, S-GPT)

immunologische Untersuchungen (B-Zell-Elispot, T-Zell-Elispot, Proliferationsassay, Elisa)

Die Untersuchung des **Stuhles** beinhaltete:

- den mikrobiologischen Erregernachweis

Die Messung der **Körpertemperatur (Temp.)** wurde axillär vorgenommen.

IX Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, daß die Dissertation von mir selbst und ohne unzulässige Hilfe Dritter verfaßt wurde. Sie stellt auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten dar. Alle benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur sind vollständig angegeben.

X Lebenslauf

Von **Oliver Palme**

Winsstr. 9
10 405 Berlin
Email: oliverpalme@web.de

Geboren am: 26.05.1974
Geburtsort: Esslingen am Neckar
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch
Kinder: Juri Braun, geb. am 10.09.2002

Ausbildung:	1978 - 1980	Besuch des evangelischen Kindergartens Deizisau
	1980 - 1984	Grundschule Deizisau
	1984 - 1993	Gymnasium Plochingen mit Abschluß Abitur, großes Latinum
	25. Mai 1993	Allgemeine Hochschulreife
	1993 – 1995	Universitätskrankenhaus Heidelberg: Zivildienst auf der kardiochirurgischen Station
	1995 – 1997	Karl-Ruprechts-Universität Heidelberg: Studium der Humanmedizin
	21. März 1997	Ärztliche Vorprüfung
	1997 – 2002	Humboldt-Universität Berlin: Studium der Humanmedizin
	27. Aug. 1998	1. Staatsexamen
	04. April 2001	2. Staatsexamen
	15. Mai 2002	3. Staatsexamen
Wissenschaftliche Arbeit:	1999 - 2002	Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie, Berlin, Prof. Meyer: Doktorarbeit: Phase 1 Studie eines Impfstoffes gegen <i>Helicobacter pylori</i> . Betreuung durch Prof. Wiedenmann Innere Klinik Charite, Campus Virchow
Veröffentlichung	Bumann D; Metzger WG; Mansouri E; Palme O; Wendland M; Hurwitz R; Haas G, Aebischer T; B.-U. von Specht and T.F. Meyer: Safety and immunogenicity of live recombinant <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhi Ty21a expressing urease A and B from <i>Helicobacter pylori</i> in human volunteers. Vaccine 12(2001)845-52	
Berufliche Tätigkeit	Nov. 2002 – Mai 2004	St. Hedwig Krankenhaus Berlin: Arzt im Praktikum, Abteilung für Innere Medizin, Prof. Dr. med. Derwahl
	Seit August 2004	St. Hedwig Krankenhaus Berlin: Arzt in Weiterbildung, Abteilung für Innere Medizin, Prof. Dr. med. Derwahl